

**UNTERSUCHUNGEN DER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN
VON (-)¹²⁵ JODOCYANOPINDOLOL AN
β- ADRENOREZEPTOREN AUF
MENSCHLICHEN LYMPHOZYTEN :
NACHWEIS EINER HETEROGENEN POPULATION
VON BINDUNGSSTELLEN**

THOMAS ANHÄUPL

~~1988~~

Disbui. München

1988

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Professor Dr. med. W. Forth

Untersuchungen der Bindungseigenschaften von $(-)^{125}$ Jodocyanopindolol
an β -Adrenorezeptoren auf menschlichen Lymphozyten:
Nachweis einer heterogenen Population von Bindungsstellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Thomas Anhäupl
aus Weiden/Opf.
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. J. Remien
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Forth Prof. Dr. med. H.-J. Kolb
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	10.03.1988

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>A. EINLEITUNG</u>	1
1. Allgemeine Definitionen	1
2. Geschichte des Rezeptorbegriffs	1
3. Das sympathikoadrenerge System	2
4. Radioligand-Rezeptorbindungsstudien	5
5. Anforderungen an Liganden in Rezeptor-Bindungsstudien	5
6. Der Radioligand $^{125}\text{Jodocyanopindolol}$	8
7. β -Adrenozeptoren auf menschlichen Lymphozyten	9
8. Ziel dieser Arbeit	10
 <u>B. MATERIAL UND METHODEN</u>	 13
1. Material	13
2. Isolierung der Lymphozyten aus menschlichem Blut	16
3. Untersuchung der Zellsuspension	19
4. Erzeugung von Lymphozytenmembranen	20

5. Äquilibriumsexperimente	20
5.1. Sättigungsexperimente	21
5.1.1. Theoretische Grundlagen	21
5.1.1.1. Die Sättigungskurve	21
5.1.1.2. Der Scatchard-Plot	25
5.1.1.3. Spezifische und unspezifische Bindung	26
5.1.1.4. Trennung des gebundenen vom freien Liganden	29
5.1.2. Sättigungsexperimente mit (-)- ¹²⁵ Jodocyano- pindolol an menschlichen Lymphozyten	29
5.2. Verdrängungsexperimente	31
5.2.1. Theoretische Grundlagen	31
5.2.2. Hemmung der Bindung von (-)- ¹²⁵ Jodocyanopin- dolol an menschliche Lymphophozyten durch Timolol	34
6. Kinetische Experimente	35
6.1. Dissoziationskinetiken	35
6.1.1. Theoretische Grundlagen	35
6.1.2. Dissoziationskinetik für (-)- ¹²⁵ Jodocyano- pindolol an menschlichen Lymphozyten	41
6.2. Assoziationskinetiken	42
6.2.1. Theoretische Grundlagen	42
6.2.2. Assoziationskinetik für (-)- ¹²⁵ Jodocyano- pindolol an menschlichen Lymphozyten	46
7. Datenverarbeitung und statistische Auswertung	46

C. ERGEBNISSE

1. Sättigungsexperimente mit (-) ¹²⁵ Jodocyanopindolol an menschlichen Lymphozyten	48
2. Hemmung der Bindung von (-) ¹²⁵ Jodocyanopindolol an menschliche Lymphophozyten durch Timolol	53
3. Dissoziationskinetik für (-) ¹²⁵ Jodocyanopindolol an menschlichen Lymphozyten	57
4. Assoziationskinetik für (-) ¹²⁵ Jodocyanopindolol an menschlichen Lymphozyten	61
5. Verfahren zur isolierten Bestimmung der hochaffinen Bindungsstelle	63

D. DISKUSSION

1. Zur Problematik der Interpretation der Ergebnisse aus Rezeptorbindungsstudien	66
2. Interpretation unserer Ergebnisse durch ein Modell zweier voneinander unabhängiger Bindungsstellen für (-) ¹²⁵ Jodocyanopindolol	69
3. Diskussion anderer Modelle	71
3.1. Das Isomerisationsmodell	71
3.2. Modell eines razemischen Liganden	73
3.3. Kooperativität	73
3.4. Transportmechanismen	74
4. Schlußfolgerungen	75

E. ZUSAMMENFASSUNG

79

F. LITERATURVERZEICHNIS

81

A. EINLEITUNG

1. Allgemeine Definitionen

Membranrezeptoren sind sensorische Elemente der Zellen. Sie ermöglichen die vielfältigen Formen der Signalübertragung im Organismus durch selektive Wechselwirkungen mit endogenen Mediatoren. Endogene Mediatoren sind Botenmoleküle des Organismus, die aufgrund ihrer chemischen Struktur selektiv an bestimmte Membranrezeptoren binden. Als Folge der Interaktion von Mediator und Membranrezeptor wird Information ins Zellinnere übertragen und schließlich eine physiologische Reaktion bewirkt. Identifikation und Analyse der chemischen Struktur der endogenen Mediatoren machten es möglich, chemisch verwandte Stoffe zu synthetisieren, bei denen die Fähigkeit, selektiv an die entsprechenden Membranrezeptoren zu binden, ebenfalls vorhanden ist. Solche Stoffe (Pharmaka), die wie die endogenen Mediatoren an die Membranrezeptoren binden und zu einem spezifischen physiologischen Effekt führen, nennt man Agonisten. Pharmaka, die an die Membranrezeptoren binden, ohne den spezifischen physiologischen Effekt herbeizuführen, und die zudem in der Lage sind, den Effekt der Agonisten durch ihre Besetzung der Membranrezeptoren zu verhindern, bezeichnet man als Antagonisten. Allgemein bezeichnet man Pharmaka, die mit hoher Spezifität an Membranrezeptoren binden (Agonisten und Antagonisten), als deren Liganden.

2. Geschichte des Rezeptorbegriffs

Die Komplementarität der Struktur von Ligand und Membranrezeptor ist der von E. M. Fischer (33) 1894 beobachteten Komplementarität von Substrat und Enzym analog ("Schloß-Schlüssel-Prinzip"). Ein Markstein bei der Entdeckung der Existenz von Membranrezeptoren als spezifischer Wirkort von Liganden war die Beschreibung der Wirkung von Pilocarpin und Atropin durch J.N. Langley (1878) (50).



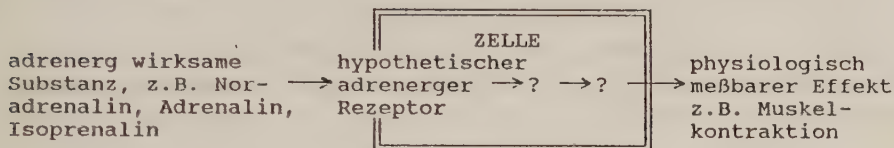
Dabei postulierte er erstmals die Grundelemente der Interaktion von Liganden und Membranrezeptoren: Die Selektivität der Bindung und die Existenz von Agonisten (Pilocarpin) und Antagonisten (Atropin). Später verallgemeinerte Langley (1905) (51,52) seine Vorstellung auf alle bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Mediatoren und Transmittersubstanzen, von denen er eine Vermittlung der Wirkung über eine Bindung an "receptive substances" annahm. P. Ehrlich (1913) prägte schließlich für den Wirkungsort pharmakologisch spezifisch wirksamer Substanzen den Begriff "Rezeptor" (30).

3. Das sympathikoadrenerge System

Das System einer Vielzahl von Hormonen, Mediatoren und Neurotransmittern mit den jeweils zugehörigen Rezeptoren dient der Anpassung der Funktion der Einzelzelle an die Erfordernisse des vielzelligen Gesamtorganismus in seiner Umwelt. Die von J.N. Langley (1904) (52) erstmals detailliert beschriebene sympathikoadrenerge Regulation ist ein Teilaspekt dieses Systems biologischer Steuerungsmechanismen (Bio-Kybernetik). Die humoralen Vermittler dieses Regelsystems sind Noradrenalin und Adrenalin. Dabei fungiert Noradrenalin in erster Linie als Neurotransmitter, der von den Nervenendigungen (Varikositäten) sympathischer Nerven freigesetzt wird. Dagegen wirkt Adrenalin eher als zirkulierendes Hormon des Nebennierenmarks. Die beiden Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin erzielen ihre physiologische Wirkung durch spezifische Bindung an Membranrezeptoren (Adrenozeptoren) der entsprechenden Zielzellen. Die Bindung an den Rezeptor ist der erste Schritt einer kaskadenartig ablaufenden Informationsübertragung über die Zellmembran, die als Barriere das äußere vom inneren Milieu der Zelle trennt.

Da das Prinzip des Informationstransports über die Plasmamembran und die folgenden intrazellulären Zwischenschritte, die schließlich zu einer physiologischen Wirkung führen, nicht bekannt war-

en, konzentrierten sich frühere Untersuchungen zunächst auf physiologische Effekte, die durch adrenerge Stimulation ausgelöst werden können:



Durch Anwendung klassischer pharmakologischer Methoden konnte durch Ahlquist (1948) die Existenz zweier unterscheidbarer Adrenozeptortypen, nämlich α - und β -Rezeptoren, bewiesen werden (4). Rezeptoren in Organen, bei denen die Wirksamkeit adrenerger Agonisten bei der Auslösung physiologischer Effekte in der Reihenfolge Adrenalin > Noradrenalin >> Isoprenalin abnahm, bezeichnete er als α -Adrenozeptoren. Nahm dagegen die pharmakologische Wirksamkeit in der Reihenfolge Isoprenalin > Adrenalin $\geq$ Noradrenalin ab, so bezeichnete er sie als β -Adrenozeptoren. Lands und anderen (48,49) gelang 1967 die Subklassifizierung der β -Adrenozeptoren in β_1 - und β_2 -Rezeptoren. War Adrenalin gleich wirksam wie Noradrenalin bei der Auslösung eines pharmakologischen Effekts, so bezeichneten sie die Betarezeptoren der Zielorgane als β_1 -Adrenozeptoren. War dagegen Adrenalin sehr viel potenter als Noradrenalin, so sprachen sie von β_2 -Adrenozeptoren. Lands nahm an, daß β_1 -Rezeptoren die adrenerge Wirkung am Herzen und im Fettgewebe vermitteln, während die Stimulierung von β_2 -Rezeptoren eine Relaxierung von glatter Muskulatur der Atemwege, Blutgefäße und des Uterus zur Folge hat.

Diese organspezifische Klassifizierung wurde durch spätere Arbeiten korrigiert. Es konnte gezeigt werden, daß Herz und Lunge über eine gemischte Rezeptorpopulation aus β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren verfügen (21,22).

Zur Funktion der β_1 - und β_2 -Rezeptoren im sympathiko-adrenergen System ist heute die Hypothese von Ariens und anderen (1983) (5) allgemein anerkannt, nach der durch sympathische Nerven inner-

vierte Zellsysteme über β_1 -Adrenozeptoren ("junctional β -adrenoceptors") reguliert werden. β -Rezeptoren an nicht durch sympathische Nerven versorgten Zellsystemen sind β_2 -Adrenozeptoren ("extrajunctional β -adrenoceptors"). An den "junctional" β -Adrenozeptoren (β_1) ist der Neurotransmitter der sympathischen Nerven, das Noradrenalin wirksam. Dagegen werden die "extrajunctional" β -Adrenozeptoren (β_2) vom zirkulierenden Nebennierenhormon Adrenalin aktiviert (Abb. 1).

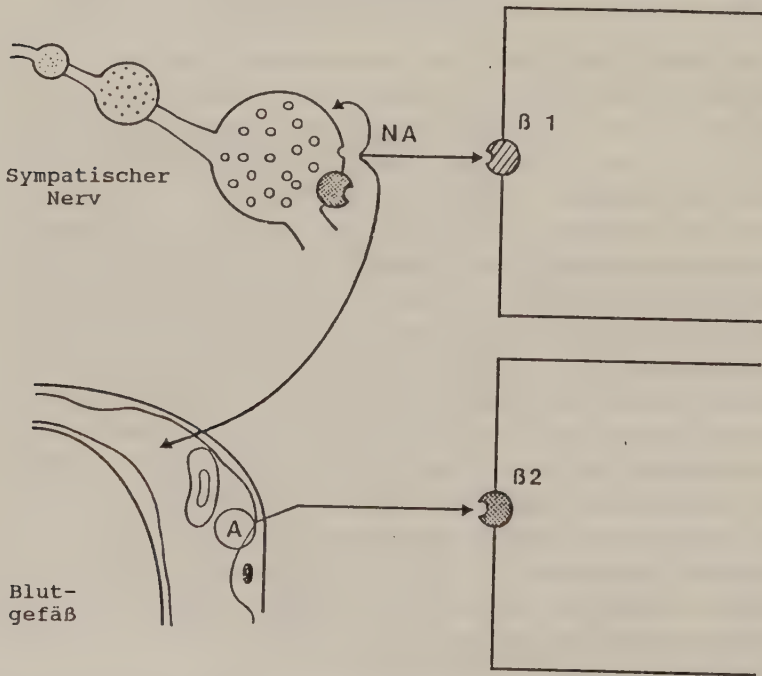


Abb. 1 Das sympathikoadrenerge System: Durch sympathische Nerven versorgte Zellsysteme werden in erster Linie durch den aus den Nervenendigungen freigesetzten Neurotransmitter Noradrenalin (NA) über β_1 -Adrenozeptoren ("junctional adrenoceptors") reguliert, während die an nicht sympathisch innervierten Zellsystemen befindlichen β_2 -Adrenozeptoren ("extrajunctional adrenoceptors") eher von dem im Blut zirkulierenden Nebennierenhormon Adrenalin (A) aktiviert werden (5,7).

4. Radioligand-Rezeptorbindungsstudien

Eine tiefgreifende Veränderung der Methodik zur Erforschung des sympathiko-adrenergen Systems brachte die Einführung radioaktiv markierter Liganden des β -Adrenozeptors. Der erste dieser Radioliganden war das Tritium-markierte ^3H -Dihydroalprenolol (^3H -DHA), das von Lefkowitz und anderen (53) 1974 eingeführt wurde. Damit wurde erstmals eine Quantifizierung von β -Adrenozeptoren in Organen und Zellsystemen möglich. Zugleich ergab sich, bedingt durch das neue Verfahren der Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien, eine völlig neue Problematik. Während in den klassischen pharmakologischen Experimenten Gegenstand der Messung ein durch Agonisten bewirkter pharmakologischer Effekt oder dessen Hemmung durch Antagonisten war, ist das Ziel von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien die Bestimmung von Qualität und Quantität der entsprechenden Rezeptoren. Die Aussagefähigkeit dieser Methode hängt dabei in erster Linie von der Auswahl geeigneter Liganden ab. Deren Eigenschaften bei der Wechselwirkung mit den zu bestimmenden Rezeptoren sind von entscheidender Bedeutung für ihre Verwendbarkeit zur Charakterisierung der Rezeptoren in Rezeptor-Bindungsstudien.

5. Anforderungen an Liganden in Rezeptor-Bindungsstudien

Maguire und andere (57) stellten eine Reihe von Kriterien für die Bindung eines Pharmakons (Liganden) an Betarezeptoren auf:

1. Es muß sich um eine sättigbare Bindung handeln, da sich auf einer Zelle bzw. an einem Organpräparat nur eine endliche Anzahl von Rezeptoren befinden kann. Wird also einer definierten Menge an Rezeptoren tragendem Gewebe der Ligand in steigender Konzentration zugesetzt, so erfolgt eine zunehmende Besetzung der Rezeptoren. Ab einer bestimmten Ligandkonzentration ist jedoch die Besetzung der Rezeptoren vollständig, eine weitere Erhöhung der Ligandkonzentration führt zu keiner weiteren Zunahme der Bindung an das Gewebe (Sättigung der Rezeptorbin-

dung). Diese Forderung entspricht der Beobachtung einer maximal erreichbaren Wirkung eines Pharmakons in einem klassischen pharmakologischen Experiment. Ab einer gewissen Konzentration des Pharmakons kommt es zu keiner weiteren Zunahme des auslösbaren Effekts.

2. Die Bindung muß möglichst spezifisch sein; das heißt, der Ligand besitzt eine hohe Affinität gegenüber dem Rezeptor. Diese Forderung ist eng verknüpft mit Forderung 1. Ein Maß für die Affinität des Liganden ist die zur halbmaximalen Besetzung der Rezeptoren notwendige Ligandkonzentration (siehe auch B.5.1.1.1.). Wie unter A.3. besprochen, erfolgte die Klassifizierung der β -Adrenozeptoren aufgrund verschiedener Reihenfolgen der Wirksamkeit bestimmter Pharmaka (Liganden) bei der Auslösung pharmakologischer Effekte. Analog zu dieser Reihenfolge verhalten sich auch die Affinitäten der Liganden den entsprechenden Rezeptoren gegenüber (hohe Wirksamkeit eines Pharmakons entspricht einer hohen Affinität zum Rezeptor).
3. Die Kinetik der Bindung sollte ähnlich der biologischen Antwort sein; das heißt, sie muß schnell erfolgen und schnell reversibel sein. Für Rezeptor-Bindungsstudien ist die Verwendung von Liganden anzustreben, die möglichst reversibel-kompetitiv mit der natürlichen Ligandbindungsstelle (Rezeptorareal) eines Membranrezeptors reagieren.
4. Es muß sich um eine stereospezifische Bindung handeln, wobei die (-)-Enantiomere der Liganden eine höhere Affinität zum Rezeptor aufweisen als die (+)-Enantiomere. Dies entspricht auch den Beobachtungen aus klassischen pharmakologischen Experimenten, in denen auch (-)-Enantiomere beta-adrenerger Substanzen eine größere biologische und pharmakologische Wirksamkeit besitzen als (+)-Isomere.

Kriterien der Bindung von Liganden an β -Adrenozeptoren wie Sättigbarkeit, Spezifität (Affinität), Reversibilität und Stereose-

lektivität sind also den Ergebnissen aus klassischen pharmakologischen Untersuchungen analog. Zugleich zeigen sich Parallelen im Bereich der Enzymologie (Tabelle 1).

Als weiteres Kriterium kommt für Radioliganden hinzu: Der Ligand muß eine möglichst hohe spezifische Aktivität aufweisen. Dies ist notwendig, um die sehr niedrigen Konzentrationen, in denen ein Radioligand mit den biologisch relevanten Bindungsstellen in Wechselwirkung tritt, überhaupt nachweisen zu können.

Tab. 1. Gegenüberstellung der den Kriterien Sättigung, Reversibilität, Spezifität und Stereoselektivität entsprechenden Merkmale in Rezeptorbindungsstudien und klassischen pharmakologischen Experimenten zur Messung β_2 -adrenerger Effekte und Vergleich mit analogen Begriffen aus der Enzymologie

	pharmakologischer Effekt	Rezeptorbindung des Liganden	enzymologisches Äquivalent
Sättigung	maximal erreichbare Wirkung	maximale Rezeptorbindung ($B_{\max}$)	maximale Reaktionsgeschwindigkeit ($V_{\max}$)
Reversibilität	Reversibilität des Effekts	Reversibilität der Bindung	Reversibilität des Enzym-Substrat-Komplexes
Spezifität	Reihenfolge der Wirksamkeit: ISO > A > NA*	Reihenfolge der Affinität: ISO > A > NA	Substratspezifität
Stereoselektivität	stärkere Wirksamkeit der (-)-Enantiomere	höhere Affinität der (-)-Enantiomere	je nach Enzym für (+)-oder (-)-Enantiomere des Substrats

*) ISO= Isoprenalin; A= Adrenalin; NA= Noradrenalin

Ein Ligand eignet sich umso besser zur Quantifizierung und Qualifizierung von Rezeptoren je mehr er die eben besprochenen Kriterien erfüllt.

6. Der Radioligand ^{125}J odocyanopindolol

1981 wurde ^{125}J odocyanopindolol ($^{125}\text{JCYP}$) von Engel und anderen (31,32) als neuer Radioligand mit hoher Affinität und Spezifität für Betarezeptoren eingeführt (Abb.2.). Seit 1984 ist das reine (-)-Enantiomer (-)- $^{125}\text{JCYP}$ verfügbar. Die Bindung von $^{125}\text{JCYP}$ ist stereoselektiv (höhere Affinität des (-)-Enantiomers), reversibel und sättigbar (32). Verdrängungsexperimente mit Isoprenalin, Noradrenalin und Adrenalin zeigten, daß die spezifischen Bindungsstellen von $^{125}\text{JCYP}$ Betarezeptoren sind. (-)- $^{125}\text{JCYP}$ besitzt selbst keine Selektivität für die Subklassen (β_1/β_2) des β -Adrenozeptors (32). Jedoch kann die Reihenfolge in der Verdrängbarkeit von $^{125}\text{JCYP}$ aus seiner Bindung durch Isoproterenol, Noradrenalin und Adrenalin zur Subklassifizierung von β -Rezeptorpopula-

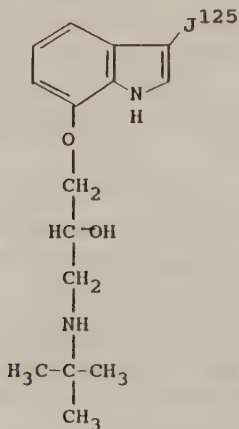


Abb. 2. Chemische Strukturformel des Radioliganden ^{125}J odocyanopindolol ($^{125}\text{JCYP}$).

tionen dienen (32). Die hohe spezifische Radioaktivität dieses Radioliganden (2000 Ci/mmol) erlaubt die Durchführung von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien mit verhältnismäßig geringen Mengen des Rezeptoren tragenden Gewebes, bzw. unter Einsatz relativ niedriger Konzentrationen des Radioliganden.

7. β -Adrenozeptoren auf menschlichen Lymphozyten

Während in klassischen pharmakologischen Experimenten der Einfluß von Pharmaka auf die physiologische Funktion kompletter Organismen, von Organen (z.B. Herz, Lunge) oder Geweben gemessen wurde, setzt die Durchführung von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien am selben Material in den meisten Fällen eine Präparation von Membranen aus einem Homogenat des zu untersuchenden Gewebes voraus. Die damit verbundene Zerstörung der Gewebs- und Zellintegrität stellt die Ergebnisse aus solchen Studien in Frage, da die Möglichkeit der Veränderung von Quantität und Qualität der Rezeptoren mit der Präparation verbunden ist. Zudem besitzen Herz und Lunge, deren Homogenate häufig für Bindungsstudien an β -Adrenozeptoren verwendet werden eine gemischte β_1 -/ β_2 -Adrenozeptorpopulation (21,22). Dies kann zu Fehlschlüssen führen, wenn Einflüsse auf die Quantität der β -Adrenozeptoren gemessen werden sollen, da z.B. bei gleichbleibender Gesamtzahl der Rezeptoren sehr wohl das Verhältnis von β_1 - zu β_2 -Adrenozeptoren verändert sein kann.

Unserer Arbeitsgruppe (71,72,73,74) und anderen (14) gelang die Charakterisierung von β -Adrenozeptoren auf menschlichen Lymphozyten mit Hilfe des Radioliganden $^{125}\text{JCYP}$. Lymphozyten sind mit einfachen Methoden aus menschlichem Blut in ausreichender Menge verfügbar. Eine Zerstörung der Zellintegrität ist für die Durchführung von Radioligand-Bindungsstudien nicht notwendig. Außerdem konnte durch Verdrängungsexperimente mit verschiedenen β -adrenergen Substanzen gezeigt werden, daß es sich bei den β -Adrenozeptoren auf menschlichen Lymphozyten um eine reine β_2 -Subpopulation

handelt (14,29). Dieser Befund entspricht auch der Annahme, daß nicht sympathisch innervierte Zellsysteme über eine β_2 -Adrenozeptor-Subpopulation verfügen (siehe auch Abschnitt A.3.).

Aufgrund dieser Vorteile bieten sich die β -Adrenozeptoren menschlicher Lymphozyten als Modell für die Gesamtheit der β_2 -Adrenozeptoren des Menschen an (11,72).

8. Ziel dieser Arbeit

Rezeptorbindungsstudien an β -Adrenozeptoren des menschlichen Lymphozyten gewinnen in zunehmendem Maße an Bedeutung bei der Erforschung sowohl physiologischer als auch pathologischer Zustände des menschlichen Organismus (1,2,12,13,15,16,17,35,37,42,43,45,46,47,61,63). Um die Ergebnisse aus solchen Bindungsstudien richtig interpretieren und anhand der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung Aussagen über beide Partner dieses Systems machen zu können, muß ein möglichst präzises Modell dieser Wechselwirkung konstruiert werden, das dann der Versuchsplanung und -auswertung zugrundegelegt werden kann.

Bisher ging man in den meisten Studien von einer homogenen und durch die Ligandbindung unbeeinflussten Klasse voneinander unabhängiger Bindungsstellen (1-Rezeptormodell) für β -adrenerge Liganden auf menschlichen Lymphozyten aus. Die Rezeptorcharakterisierung in diesen Arbeiten erfolgte fast ausschließlich aufgrund von Sättigungsexperimenten in einem relativ begrenzten Konzentrationsbereich des Radioliganden.

Einige Arbeitsgruppen (67,79,80) fanden dagegen in Sättigungsexperimenten über einen erweiterten Konzentrationsbereich Hinweise auf eine heterogene Bindungsstellenpopulation für adrenerge Liganden auf Lymphozyten. Kinetische Untersuchungen des dabei häufig verwendeten Liganden $^{125}\text{JCYP}$ an Membranpräparationen vom linken Ventrikel des Meerschweinchenherzens ergaben biphasische Dis-

soziationskinetiken, die sich aus einer schnell und einer langsam dissozzierenden Komponente des Radioliganden zusammensetzten (38).

Derartige Beobachtungen widersprechen jedoch dem einfachen 1-Rezeptormodell. Sie eröffnen die Möglichkeit einer Reihe alternativer Modelle der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung:

1. Das Modell mehrerer unabhängiger Klassen von Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten zum Liganden.
2. Modell eines uneinheitlichen Liganden (z.B. razemisches Gemisch aus (+)- und (-)-Enantiomer), wobei unterschiedliche Affinitäten der verschiedenen Ligand-Subtypen gegenüber einer einheitlichen Rezeptorpopulation bestehen (19).
3. Isomerisationsmodell: Überführung des Rezeptors in einen anderen Bindungszustand durch die Bindung des Liganden (38).
4. Kooperativität (analog den Verhältnissen beim Insulin-Rezeptor) (30).
5. Transportmechanismen: Aufnahme des Liganden in zelluläre Kompartimente neben seiner Bindung an Rezeptoren (56).

Bis heute konnte jedoch keines der genannten Modelle widerspruchsfrei gegenüber den anderen durchgesetzt werden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, in Bindungsstudien (Sättigungs- und Verdrängungsexperimente, sowie Assoziations- und Dissoziationskinetiken) an menschlichen Lymphozyten mit dem Radioliganden $^{125}\text{JCYP}$ die experimentellen Möglichkeiten von Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien soweit auszuschöpfen bis die Festlegung auf ein widerspruchsfreies Modell möglich war. Zugleich sollten konkurrierende Modellvorstellungen ausgeschlossen werden.

Dabei bietet der menschliche Lymphozyt als Untersuchungsmaterial und $^{125}\text{JCYP}$ als Radioligand entscheidende Vorteile gegenüber anderen Systemen:

Aufgrund theoretischer Überlegungen (7) (siehe A.3.) und wie auch die Ergebnisse aus Verdrängungsexperimenten mit verschiedenen β -adrenergen Liganden zeigen (14,42), handelt es sich bei den β -Adrenozeptoren menschlicher Lymphozyten um eine reine β_2 -Subpo-

pulation, so daß komplexe Bindungsverhältnisse nicht, wie in anderen Geweben (Herz, Lunge) möglich, durch das Vorliegen einer gemischten β_1 -/ β_2 -Adrenozeptorpopulation erklärt werden können. Zudem sind aufgrund der extrem hohen Affinität dieses Radioliganden gegenüber β -Adrenozeptoren (verglichen etwa mit ^3H -DHA) und der problemlosen Zugänglichkeit des Untersuchungsmaterials neben Membranpräparationen (zerschlagene Zellen) auch Untersuchungen am intakten lebenden Zellsystems möglich. Gerade dieser Vergleich spielt eine große Rolle bei der Suche nach einem eindeutigen Modell der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

Puffer:

HH-Puffer: Hepes gepufferte Salzlösung nach Hank

Salzlösung nach Hank: Die verwendeten Salze waren von analytischer Reinheit und wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen. Zusammensetzung:

	mg/l	mmol/l
Kalziumchlorid (CaCl_2)	185.5	1.26
Kaliumchlorid (KCl)	400.0	5.40
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	60.0	0.44
Magnesiumphosphat (MgSO_4)	200.0	0.80
Natriumchlorid (NaCl)	8000.0	136.90
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	60.0	0.42
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	350.0	4.30

Hepes: Hersteller: Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
Zusammensetzung: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonäure ($\text{pK}_a=7.5$) 5800.0 mg/l (25.00 mmol/l)

TRIS-Puffer: Tris/HCl gepufferte Magnesiumchloridlösung
Zusammensetzung:

	mg/l	mmol/l
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	4810.0	40.00
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	4060.0	20.00
(Hersteller: Fa. Merck, Darmstadt)		

Die Pufferlösungen wurden in Aqua tridest. (Millipore^R) angesetzt. Dem HH-Puffer wurde zusätzlich als Indikator Phenolrot (10 mg/l) zugesetzt. Der pH-Wert der Pufferlösungen wurde mit Hilfe

einer geeichten Glaselektrode durch Zugabe von HCl bzw. NaOH auf pH 7.4 eingestellt.

Chemikalien:

EDTA: Ethylendinitrolotetraessigsäure Dinatriumsalz (Titriplex^R III). Hersteller: Fa. Merck, Darmstadt

Lymphopaque: Hersteller: Nyegard & Co., Oslo, Norwegen. Zusammensetzung: Sodium Metrizoat und eine Mischung verschiedener Polydextrane (zur Gradientenzentrifugation), Dichte: 1.086 g/ml.

(-)¹²⁵Jodocyanopindolol (¹²⁵JCYP): Hersteller: Amersham Buchler, Braunschweig; spezifischen Aktivität 2000 Ci/mmol.

(-)Timololmaleat

Blutentnahmesystem:

Spritzen zur Blutentnahme (20 ml): steril, zum einmaligen Gebrauch. Hersteller: Pharmaplast Braunschweig AG.

Kanülen zur Blutentnahme: steril, zum einmaligen Gebrauch. Größe: 0.90x38 mm/ 20Gx1.5 (gelb). Hersteller: Hartmann AG, Heidenheim.

Pipetten und Reaktionsgefäße:

Pasteurpipetten aus Glas, Länge 150 mm: Hersteller: Fa. Rudolf Brand GmbH + Co., Wertheim/M.-Glashütte.

Verstellbare Pipetten (200 l, 1000 l, 5000 l): Vertrieb Fa. Abimed, Düsseldorf. Hersteller: Fa. Gilson, Frankreich; Typ Repetman.

Eppendorf Multipipette^R 4780 (zum Pipettieren der Zellsuspension): Hersteller: Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg.

Pipettenspitzen für verstellbare Pipetten (gelb, blau): Vertrieb Fa. Abimed, Düsseldorf. Hersteller: Fa. Gilson, Frankreich.

Combitips (0.5 ml, 5 ml, 12.5 ml) für Eppendorf Multipipette^R 4780: Hersteller: Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg.

Reaktionsgefäße: PPN-Röhrchen 4ml. Hersteller: C.A. Greiner und Söhne GmbH & Co KG, Nürtingen.

Zentrifugen und Zentrifugengefäße:

Swing-out Zentrifuge der Firma Christ, Schleuderradius 11.5 cm

Festrotor Zentrifuge Typ 8590 der Firma Heraeus-Christ, Osterode.

Zentrifugengefäße 12 ml aus Kunststoff: Hersteller: Fa. Sarstett, Neu-Ulm.

Zentrifugengläser 24 ml aus Kunststoff, verschließbar: Hersteller: C.A. Greiner und Söhne GmbH & Co KG, Nürtingen.

Zentrifugengefäße 30 ml aus Kunststoff: Hersteller: Fa. Beckmann, Palo Alto, Ca., USA.

Geräte und Rechner:

Wassersystem: Milli-Q watersystem. Hersteller: Millipore Corp., Bedford, Mass., USA.

Coulter Counter, Channalyzer, XY-Schreiber: Hersteller: Coulter Electronics Ltd., Harpenden Herts, England.

Mikroskop der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Württ..

Ultraschallgerät: Hersteller: Branson Sonic Power Company, Danbury, Conn., USA.

Wasserbad: Gyrotory Water Bath Shaker (model G76); Hersteller: New Brunswick Scientific, New Brunswick, N.J., USA.

Absauganlage: Hersteller: Millipore Corporation, Bedford, Mass., USA. Topf: Mod.Nr. XX2702550; Pumpe: Mod.Nr. 5KH33EN25T.

Whatman^R GF/B Filter (Glasfaserfilter zur Absauganlage): Hersteller: Whatman Ltd., Maidstone, England.

Gamma Counter: Auto Gamma Scintillation Spectrometer (model 5260) Hersteller: Hewlett Packard, Palo Alto, Ca., USA.

Rechner: Commodore 3032; Diskettenlaufwerk: Commodore floppy disk 3040; Hersteller: Commodore Business Machines Inc., Palo Alto, Ca., USA.

Plotter: Watanabe Miplot WX4671. Hersteller: Watanabe Instruments Corp., Tokyo, Japan.

2. Isolierung der Lymphozyten aus menschlichem Blut

Man findet dazu in der Literatur verschiedene Modifikationen der Methode nach Böyum (10), durch die mononukleäre Zellen, das sind größtenteils Lymphozyten und auch Monozyten, aus dem Blut isoliert werden. [Anmerkung: Da Lymphozyten und Monozyten eine ähnliche Dichte besitzen, sind sie durch Dichtegradientenzentrifugation mit Lymphopaque nicht zu trennen. Es wäre daher exakter, die so isolierten Zellen als mononukleäre Zellen zu bezeichnen. Da jedoch in der Literatur die nach dieser Methode isolierten Zellen in überwiegendem Maße als Lymphozyten bezeichnet werden, werden auch wir im folgenden nur noch von Lymphozyten sprechen.] Die von Autor zu Autor sich ändernden Präparationsverfahren spie-

geln die Schwierigkeit wider, aus dem menschlichen Blut eine möglichst reine Lymphozytensuspension zu gewinnen. Bei unseren Untersuchungen wurde die Methode nach Böyum gering modifiziert.

Gesunden freiwilligen Erwachsenen wurde vormittags (zwischen 9⁰⁰ und 11⁰⁰ Uhr) 50-150 ml Blut durch Venenpunktion entnommen und sofort weiterverarbeitet. Das Blut wurde zur Antikoagulation mit EDTA (10mg/ml) versetzt und anschließend mit HH-Puffer im Verhältnis 1:1 verdünnt. Das Blut-Puffer-Gemisch wurde dann mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt.

Prinzip: Eine Zellsuspension und ein Auftrennungsmedium definierter Dichte und Viskosität werden übereinandergeschichtet. Zentrifugiert man nun dieses Zwei-Phasen-System, so ist die Sedimentationsgeschwindigkeit der Zellen proportional zu ihrer Größe und der Differenz ihrer Dichte zur Dichte des Umgebungsmediums. Bei gleicher Dichte von Zellen und Umgebungsmedium wird die Sedimentationsgeschwindigkeit gleich Null.

Das mit Puffer verdünnte Blut wurde dazu mit einer Pasteurpipette vorsichtig (zur Vermeidung von Vermischungen) auf, in 24 ml Zentrifugengefäße verteiltes, Lymphopaque aufgeschichtet (etwa 2 Volumenteile Blut-Puffer-Gemisch auf 1 Volumenteil Lymphopaque). Das als Auftrennungsmedium verwendete Lymphopaque besteht aus einer wässrigen Lösung verschiedener Polydextrane und Natrium-Metrizoat (Dichte 1.086 g/ml). Es trennt die zellulären Bestandteile des Blutes hauptsächlich in zwei Fraktionen: Lymphozyten mit Monozyten (mononukleäre Zellen) und Erythrozyten mit Granulozyten.

Das Blut-Lymphopaque-System wurde dann 30 Minuten in einer Swing-out Zentrifuge bei 800g (2500 U/min, 11.5cm Schleuderradius) zentrifugiert. Anschließend waren in den Zentrifugengefäßen vier Schichten unterscheidbar (von oben nach unten):

- Gemisch aus Plasma und Puffer mit Thrombozyten.
- "Lymphozytenring", bestehend aus Lymphozyten und Monozyten (mononukleäre Zellen).

Venöses Blut mit EDTA (10mg/ml)



Verdünnung 1:1 mit HH-Puffer



Aufschichten auf Lymphopaque:



← 2/3 Blut-Puffergemisch

← 1/3 Lymphopaque



Zentrifugation (30 min, 800g)



← Plasma, Puffer und Thrombozyten

← Lymphozyten und Monozyten
← =mononukleäre Zellen

← Lymphopaque

← Granulozyten und
Erythrozyten



Mononukleäre Zellen in HH-Puffer suspendieren



Waschen mit HH-Puffer

Abb.3. Isolierung der Lymphozyten aus menschlichem Blut (Einzelheiten siehe Methoden, Kapitel 2)

- Lymphopaque
- Granulozyten und Erythrozyten (Sie gelangen aufgrund ihrer höheren Dichte durch das Lymphopaque hindurch auf den Boden des Gefäßes. Die Granulozyten bleiben auf den Erythrozyten liegen.)

Nun wurde zunächst das Plasma-Puffergemisch mit einer auf schwachen Sog eingestellten Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Dann wurde der Lymphozytenring vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in HH-Puffer suspendiert. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, daß lediglich die weißliche Zellschicht auf dem Lymphopaque erfaßt wurde. (Zuviel miterfaßtes Plasma führt zu einer Verunreinigung mit Serumproteinen und Thrombozyten, zuviel mit abgenommenes Lymphopaque zu einer Verunreinigung mit Granulozyten.)

Danach wurde die Zellsuspension (Lymphozytenring in HH-Puffer) in der Swing-out Zentrifuge 20 Minuten bei 750g (2000 U/min) zentrifugiert. Der Überstand (hauptsächlich HH-Puffer mit Plasmaproteinen und Thrombozyten) wurde verworfen. Das Zellpellet wurde erneut in HH-Puffer aufgenommen und der Waschvorgang noch einmal wiederholt.

Die im Folgenden beschriebenen Bindungsstudien an intakten Zellen wurden mit der so erhaltenen Zellsuspension durchgeführt.

3. Untersuchung der Zellsuspension

Die Zellzahl der Zell-Puffer-Suspension wurde mittels eines Zellcounters der Firma Coulter Electronics Ltd. bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit HH-Puffer auf eine Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt (entspricht 1×10^6 Zellen/ml in den Inkubationsansätzen, da immer 100 l der Zellsuspension in Ansätze mit 500 l Endvolumen pipettiert wurden).

Die Größenverteilung der zellulären Elemente der Suspension wurde mit einem Coulter-channelyzer analysiert und mittels eines XY-

Schreibers aufgezeichnet und so dokumentiert. Der Lymphozytenanteil der Zellpräparation konnte dabei durch Integration des zugehörigen Peaks bestimmt werden.

4. Erzeugung von Lymphozytenmembranen

Zur Präparation von Lymphozytenmembranen wurde die Zellsuspension zunächst nochmals abzentrifugiert (Swing-out Zentrifuge, 600g, 10 Minuten), um den für intakte Zellen verwendeten HH-Puffer durch TRIS-Puffer zu ersetzen. Anschließend wurden die Zellen durch dreimalige Anwendung von Ultraschall zerschlagen. Die Übertragung des Ultraschalls ins Puffermedium und damit auf die Zellen erfolgte mit einem sich konisch verjüngenden Metallstab, der in die Zellsuspension eingetaucht wurde. Die Beschallungszeiten betrugen dreimal drei Sekunden bei einer Amplitude von 12 μm (peak to peak). Die so erhaltenen Membranen wurden mit einer Festrotor-Zentrifuge (Fa. Heraeus Christ) 30 Minuten bei 15000g zentrifugiert und wieder in TRIS-Puffer aufgenommen. Nach Aufwirbeln des Pellets wurde erneut Ultraschall in der eben beschriebenen Weise angewandt, um Zusammenballungen von Membranvesikeln im Pellet wieder aufzulösen.

5. Äquilibriumsexperimente

Sie dienen der Charakterisierung der Bindungseigenschaften eines Liganden im Gleichgewicht (Äquilibrium) zwischen Ausbildung (Assoziation) und Wiederauflösung (Dissoziation) der Rezeptorbindung des Liganden. Man unterscheidet zwei Arten von Äquilibriumsexperimenten:

1. Sättigungsexperimente
2. Hemmungsexperimente

5.1. Sättigungsexperimente

Dabei wird Rezeptoren tragendes Gewebe bis zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Ausbildung (Assoziation) und Wiederauflösung (Dissoziation) der Rezeptorbindung mit steigenden Konzentrationen eines Radioliganden inkubiert. Anschließend wird der spezifisch an die Rezeptoren gebundene Anteil des Radioliganden bestimmt. Aus diesen Bindungsdaten kann dann aufgrund mathematischer Modelle und Gleichungen die Rezeptorendichte und die Affinität des Radioliganden zu den Rezeptoren berechnet werden.

5.1.1. Theoretische Grundlagen

5.1.1.1. Die Sättigungskurve

Das einfachste Modell der Wechselwirkung zwischen Liganden und Rezeptoren setzt einen einheitlichen univalenten Liganden und eine einzige Klasse einheitlicher, voneinander unabhängiger Bindungsstellen (Rezeptoren) voraus. Diese Situation läßt sich unter Zugrundelegung des Massenwirkungsgesetzes durch eine einfache bimolekulare Reaktion (Reaktion zweiter Ordnung) zwischen einem Liganden und einem Rezeptor beschreiben (18,86):



R = Rezeptor

L = Ligand

RL = Rezeptor-Ligand-Komplex

k_{+1} = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Die Anzahl der durch den Liganden besetzten Rezeptoren ist also abhängig von der Konzentration an Rezeptor und Ligand, sowie von den Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung (Assoziation) und den Zerfall (Dissoziation) des Rezeptor-Ligand-Komplexes. Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht, d.h. Assoziation und Dis-

soziation gehen gleich schnell vor sich, so ist nach dem Massenwirkungsgesetz die Gleichgewichtsdissoziationskonstante definiert als:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \times [L]}{[RL]} \quad (2)$$

K_D = Gleichgewichtsdissoziationskonstante
 $[L]$ = Konzentration des Liganden
 $[R]$ = Konzentration des freien Rezeptors
 $[RL]$ = Konzentration des durch den Liganden besetzten Rezeptors (Rezeptor-Ligand-Komplex)

Sind 50% der Rezeptoren durch den Liganden besetzt, so gilt:

$$[R] = [RL] \quad (3)$$

Setzt man diese Beziehung in Gleichung 2 ein, so ergibt sich:

$$K_D = [L] \quad (4)$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) gibt also diejenige freie Ligandenkonzentration an, bei der 50% der Rezeptoren besetzt sind. Sie verhält sich umgekehrt proportional zur Affinität eines Liganden zu einem bestimmten Rezeptor und dient somit als Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor. Eine hohe K_D entspricht also einer niedrigen Affinität, während eine niedrige K_D einer hohen Affinität des Liganden zum Rezeptor entspricht.

Weiterhin muß für die Gleichung 2 berücksichtigt werden, daß die totale Rezeptorkonzentration $[R_T]$ sich aus der Summe der freien Rezeptorkonzentration $[R]$ und der Konzentration der im Komplex $[RL]$ gebundenen Rezeptoren zusammensetzt:

$$[R_T] = [R] + [RL] \quad (5)$$

oder:

$$[R] = [R_T] - [RL] \quad (6)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 6 in Gleichung 2 folgt:

$$K_D = \frac{([R_T] - [RL]) \times [L]}{[RL]} \quad (7)$$

Umformen und Auflösung nach [RL] ergibt:

$$\begin{aligned} K_D \times [RL] &= [R_T] \times [L] - [RL] \times [L] \\ K_D \times [RL] + [RL] \times [L] &= [R_T] \times [L] \\ [RL] \times (K_D + [L]) &= [R_T] \times [L] \\ [RL] &= \frac{[R_T] \times [L]}{K_D + [L]} \end{aligned} \quad (8)$$

In der Literatur hat sich dafür eine andere Nomenklatur eingebürgert:

[RL] = B (bound)

[L] = F (free)

[R_T] = B_{max} (maximal number of binding sites)

Aus Gleichung 8 ergibt sich so:

$$B = \frac{B_{\max} \times F}{K_D + F} \quad (9)$$

Diese Gleichung stellt die allgemeine Sättigungsfunktion dar (Abb.4.). Sie ist der Michaelis-Menten-Gleichung der Enzymkinetik äquivalent (86).

Anmerkung: Die freie Ligandenkonzentration (F) ist nur dann identisch mit der Gesamtkonzentration des Liganden, wenn dieser in großem Überschuß in bezug auf die Menge an gebundenem Liganden vorliegt. Ist dies nicht der Fall, so muß F als Differenz aus der Gesamtkonzentration und der gebundenen Konzentration des Liganden berechnet werden (40).

Wie in Abbildung 4 ersichtlich, können, sofern ein Bindungsplateau erreicht wird, die Bindungsparameter $B_{\max}$ und K_D eines Liganden aus der Sättigungskurve abgelesen werden. Dieses Bindungsplateau kann jedoch, aufgrund der dafür notwendigen hohen Ligandkonzentrationen und wegen der Streuung der Meßpunkte, experimentell meist nicht sicher bestimmt werden. Deshalb ist man bestrebt, eine lineare Beziehung zwischen den Bindungsdaten eines Sättigungsexperiments herzustellen.

Um die Ermittlung von $B_{\max}$ und K_D auf der Basis einer linearen Regression zu ermöglichen, muß jedoch die Bindungskurve durch Transformation in eine lineare Form gebracht werden. Hierzu existieren eine Reihe von Verfahren (86). Dabei ist das gebräuchlichste Transformationsverfahren für Bindungsdaten aus Sättigungsexperimenten der Scatchard-Plot.

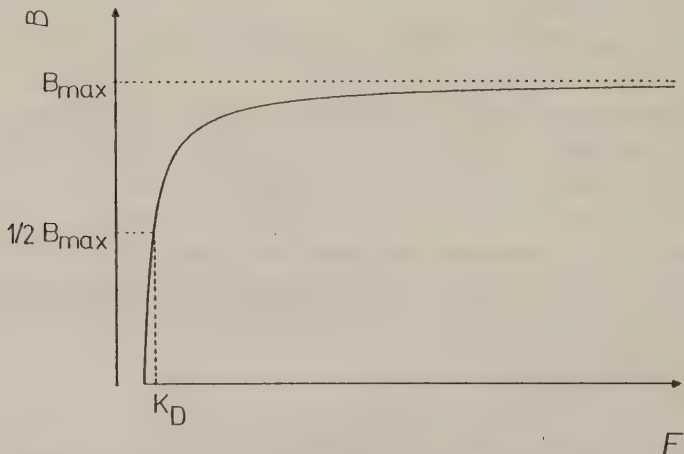


Abb.4. Sättigungskurve: Sie dient der Darstellung von Sättigungsexperimenten durch Auftragung des spezifisch gebundenen Radioliganden (B) gegen die Konzentration des freien Radioliganden (F). Bei hohen Konzentrationen des freien Radioliganden erreicht die Kurve ein Bindungsplateau. Der Schnittpunkt der Asymptote an dieses Plateau mit der Ordinate ergibt die maximale Bindungskapazität ($B_{\max}$). Der Schnittpunkt des Lots von dem Punkt der Kurve bei dem 50% der Rezeptoren besetzt sind ($\frac{1}{2} B_{\max}$) mit der Abszisse ergibt die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D .

5.1.1.2. Der Scatchard-Plot

Dieses von Scatchard (81) eingeführte Verfahren zur Linearisierung von Bindungsdaten beruht auf ähnliche Methoden aus der Enzymkinetik.

Die Scatchard-Gleichung 10 läßt sich aus der Sättigungsfunktion (Gleichung 9) ableiten:

$$B = \frac{B_{\max} \times F}{K_D + F}$$

$$B \times (K_D + F) = B_{\max} \times F$$

$$K_D \times B + F \times B = B_{\max} \times F \quad | \times 1/F \times K_D$$

$B/F = -1/K_D \times B + B_{\max}/K_D$

(10)

Dieser Ausdruck entspricht einer Geradengleichung ($y = -ax + b$). Den Scatchard-Plot erhält man durch die Auftragung der Konzentration des gebundenen Liganden (B) gegen den Quotienten von gebundenem und freiem Liganden (B/F) wie dies in Abbildung 5 dargestellt ist.

Die Steigung der Geraden ergibt den negativen reziproken Wert der Gleichgewichtsdissoziationskonstante ($-1/K_D$), ihr Schnittpunkt mit der Abszisse (bei $B/F=0$) die Bindungsstellendichte ($B_{\max}$).

Damit ist der einfache Fall einer homogenen Rezeptorpopulation mit nichtinteragierenden Bindungsstellen (linearer Scatchard-Plot) beschrieben.

Ergeben sich jedoch von einer Geraden abweichende Kurvenverläufe im Scatchard-Plot, so kann diese graphische Auftragung in begrenztem Umfang zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Rezeptormodellen dienen. Beispielsweise führt positive Kooperativität zu einer nach oben konvexen Kurve im Scatchard-Plot, die Ausdruck dafür ist, daß durch die Bindung des Liganden die Affinität der noch unbesetzten Bindungsstellen zunimmt. Eine nach oben konkave

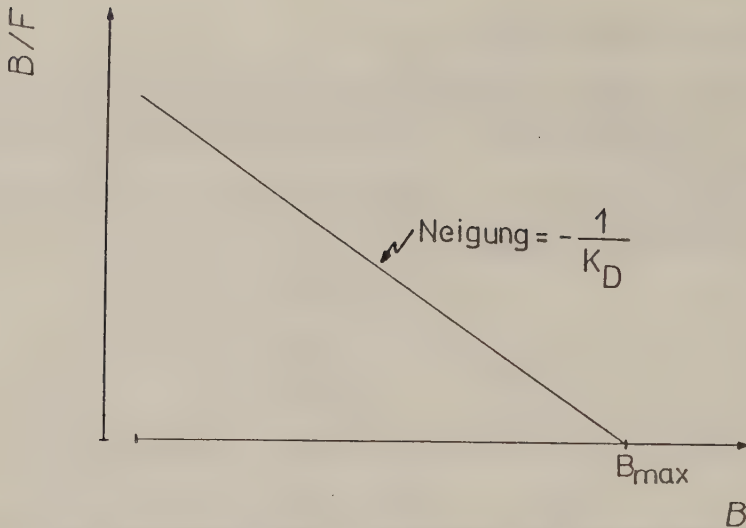


Abb. 5 Scatchard-Plot: Durch Auftragung der Konzentration des gebundenen Liganden gegen den Quotienten aus gebundenem und freiem Liganden erhält man unter der Voraussetzung einer homogenen Rezeptorpopulation eine Linearisierung der Sättigungskurve. Aus der Neigung der Geraden ($-1/K_D$) kann die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D , aus ihrem Abszissenschnittpunkt die Menge der Bindungsstellen ($B_{\max}$) berechnet werden.

Kurve kann sowohl Ausdruck einer negativen Kooperativität als auch zweier unabhängiger Rezeptorpopulationen mit unterschiedlichen Affinitäten zum Liganden sein (62).

5.1.1.3. Spezifische und unspezifische Bindung

Das bisher über die Ligandenbindung Gesagte bezog sich ausschließlich auf die Bindung von Liganden an spezifische Bindungsstellen (Rezeptoren). Diese sind charakterisiert durch eine begrenzte Anzahl und eine relativ hohe Affinität des Liganden zu ihnen. Da die Anzahl spezifischer Bindungsstellen nur eine endliche Zahl sein kann, muß die spezifische Bindung ebenfalls endlich, d.h. sättigbar sein. Dies entspricht dem Erreichen eines Bindungsplateaus (Abb.4. und Abb.6.).

Liganden binden aber nie ausschließlich an spezifische Bindungsstellen, sondern immer auch unspezifisch an andere Strukturen. Solche unspezifische Bindungsorte unterscheiden sich von den spezifischen Bindungsstellen durch ihre nahezu unbegrenzte Anzahl und durch eine sehr niedrige Affinität der Liganden ihnen gegenüber. Unspezifische Bindungsorte können sein: Proteine, Lipide, Glykane, Zellmembranen und -kompartimente, sowie Materialien, die während des Versuchs verwendet werden, wie Kunststoffe oder Filteroberflächen. Da unspezifische Bindungsorte in nahezu unendlicher Anzahl vorhanden sind, erreicht die unspezifische Bindung eines Liganden kein Bindungsplateau, sie ist also nicht sättigbar. Die Bindungskurve unspezifischer Bindungsorte stellt sich deshalb als eine durch den Nullpunkt gehende Gerade dar (Abb.6.).

Nun zur Bedeutung dieser Zusammenhänge für die praktische Durchführung von Sättigungsexperimenten mittels eines Radio-Rezeptorassays:

Dabei wird in einem Versuchsansatz das zu untersuchende, Rezeptoren tragende Gewebe mit steigenden Konzentrationen eines Radioliganden solange inkubiert, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation eingestellt hat (=Äquilibration). Anschließend wird der an das Gewebe gebundene Anteil des Radioliganden vom ungebundenen, freien Anteil im Inkubationsmedium abgetrennt (siehe B.5.1.1.4) und gemessen. Die sich daraus ergebende Bindungskurve repräsentiert, wie aus dem oben Gesagten hervorgeht, die Summe der Bindung des Radioliganden an spezifische Bindungsstellen (Rezeptoren) und unspezifische Bindungsorte. Sie wird deshalb auch als Gesamtbindungskurve benannt (---- in Abb.6.).

Parallel dazu wird in einem zweiten Versuchsansatz die unspezifische Bindung des Radioliganden bestimmt. Dabei wird das zu untersuchende Gewebe auch mit steigenden Konzentrationen des Radioliganden äquilibriert, aber im Gegensatz zum ersten Versuchsansatz in Gegenwart eines großen Überschusses eines zweiten, unmarkierten Liganden. Der Anteil der selektiven Rezeptorbindung des Ra-

dioliganden (spezifische Bindung) wird so wegen des Überschußes des unmarkierten, aber ebenfalls selektiv an die Rezeptoren bindenden zweiten Liganden, aus seiner Bindung verdrängt. Man nennt den unmarkierten Liganden deshalb auch Verdränger. Angesichts ihrer hohen Zahl und geringen Affinität werden dagegen die unspezifischen Bindungsstellen in ihrer Wechselwirkung mit dem Radioliganden hiervon nicht meßbar beeinflußt. Die nach Abtrennung des ungebundenen Liganden aus diesem Versuchsansatz resultierende Bindungskurve entspricht also der unspezifischen Bindung (--- in Abb.6.).

Aus diesen beiden Versuchsansätzen läßt sich nun durch einfache Subtraktion der Bindungsdaten aus Gesamtbindung und unspezifischer Bindung die spezifische Bindung des Radioliganden ermitteln (— in Abb.6.).

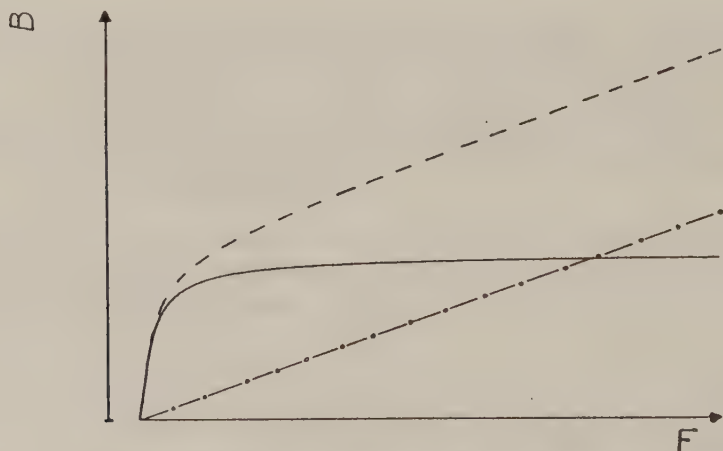


Abb. 6. Bindungskurven eines Radioliganden an Rezeptoren tragendem Gewebe: Die Gesamtbindung (----) des Radioliganden an das Gewebe setzt sich aus spezifischer und unspezifischer Bindung zusammen. Die unspezifische Bindung des Radioliganden (- - -) wird in Gegenwart eines Überschusses eines zweiten, nicht markierten Liganden (Verdränger) bestimmt (dadurch erfolgt eine Verdrängung des Radioliganden von den spezifischen Bindungsstellen). Sie ist nicht sättigbar (linear, kein Bindungsplateau). Aus der Differenz von Gesamt- und unspezifischer Bindung ergibt sich die spezifische, sättigbare Rezeptorbindung (—; Bindungsplateau).

5.1.1.4. Trennung des gebundenen vom freien Liganden

Die Beendigung von Bindungsreaktionen erfolgt durch Trennung des gebundenen Radioliganden von dem im Inkubationsmedium verbleibenden freien Liganden. Die dazu üblichen Methoden sind Filtration und Zentrifugation.

Bei der in den meisten Fällen angewandten Filtrationsmethode wird das Inkubationsgemisch auf ein über ein Vakuum platziertes Filter gegeben. Durch das Vakuum wird die Inkubationslösung abgezogen. Das Gewebe und die daran gebundene Radioaktivität bleiben auf dem Filter zurück. Gewebe und Filter müssen anschließend zur Auswaschung des ungebundenen Liganden mit einem eiskalten Medium nachgewaschen werden.

5.1.2. Sättigungsexperimente mit (-)-¹²⁵Jodocyanopindolol an menschlichen Lymphozyten

In unseren Versuchen bestand das zu untersuchende Gewebe aus intakten und zerschlagenen menschlichen Lymphozyten. Als Radioligand verwendeten wir (-)-¹²⁵Jodocyanopindolol (¹²⁵JCYP) und als zweiten, unmarkierten Liganden (-)-Timolol (Verdränger). Als Inkubationsmedium diente HH-Puffer in den Versuchen an intakten Lymphozyten und TRIS-Puffer in den Versuchen an Lymphozytenmembranen.

Zur Bestimmung der Gesamtbindung wurden intakte Zellen (0.5×10^6 Zellen/500 l), bzw. Membranen (0.5×10^6 zerschlagene Zellen/500 l) mit acht bis sechzehn verschiedenen ¹²⁵JCYP Konzentrationen zwischen 1.5 und 600 pmol/l in Einzelproben zu 0.5 ml 120 Minuten lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Parallel dazu wurde die nicht-sättigbare Bindung des Radioliganden durch Inkubation in Anwesenheit des Verdrängers (-)-Timolol im Überschuß (10^{-6} mol/l) bestimmt (unspezifische Bindung).

Die Inkubationsphase wurde in beiden Versuchsansätzen durch Zugabe der Zell- bzw. Membransuspension gestartet. Am Ende der Inku-

bation wurde die an das Gewebe gebundene Radioaktivität vom freien, ungebundenen Radioligand im Inkubationsmedium durch rasche Vakuumfiltration über Whatman^R GF/B Glasfaserfilter getrennt und damit die Inkubationsphase beendet. Die an die Filter adsorbierten Zellen, bzw. Zellfragmente wurden zur Auswaschung von ungebundenem $^{125}\text{JCYP}$ dreimal mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung (jeweils 3 ml) nachgewaschen.

Anschließend wurde die im Filtrerrückstand verbleibende Radioaktivität in einem Beckman Zweikanal Gammacounter mit einer durchschnittlichen Ausbeute (efficiency) von 80% gemessen. [^{125}J zerfällt mit einer Halbwertszeit von 60 Tagen unter Abgabe von γ -Strahlen zu Tellur.]

Die Differenz der Bindung aus den Inkubationen in Abwesenheit von Timolol (Gesamtbindung) und in Anwesenheit von Timolol (unspezifische Bindung) ergab die spezifische $^{125}\text{JCYP}$ Bindung. Dabei wurde jeder Meßpunkt als Doppel- oder Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die freie $^{125}\text{JCYP}$ Konzentration wurde durch Subtraktion der gebundenen Konzentration von der eingesetzten Konzentration des Radioliganden für jeden Meßpunkt berechnet.

Durch Anpassung der spezifischen Bindung in Abhängigkeit von der freien $^{125}\text{JCYP}$ Konzentration an die allgemeine Form der Sättigungsfunktion für eine oder mehrere voneinander unabhängige Klassen von Bindungsstellen (Gleichung 11) konnten die Bindungsparameter K_{Di} und $B_{\text{max}i}$ errechnet werden.

$$B = \sum_{i=1}^n B_i = \sum_{i=1}^n \frac{B_{\text{max}i} \times F}{K_D + F} \quad (11)$$

- B = Konzentration des spezifisch gebundenen Liganden
- B_i = Konzentration des spezifisch an Bindungsstellen der Klasse i gebundenen Liganden
- F = Konzentration des ungebundenen (freien) Liganden
- $B_{\text{max}i}$ = Anzahl der Bindungsstellen der Klasse i pro Zelle
- K_{Di} = Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindungsstellen der Klasse i

In der Kurvenanpassung für zwei voneinander unabhängige Klassen von Bindungsstellen ($n=2$ in Gleichung 11) waren $B_{\max 1}$ und K_{D1} die Bindungsparameter für die hochaffine Bindungsstelle, während $B_{\max 2}$ und K_{D2} die niederaffine Bindungsstelle charakterisierten.

5.2. Verdrängungsexperimente

Hier handelt es sich ebenfalls um Versuche unter Äquilibriumbedingungen (Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation von Liganden). Dabei wird das zu untersuchende Gewebe mit einer einzigen Konzentration eines Radioliganden in Gegenwart von steigenden Konzentrationen eines kompetitiv wirkenden, unmarkierten Liganden (Inhibitor, Verdränger) äquilibriert. Aus der zunehmenden Verdrängung des Radioliganden aus der Rezeptorbindung kann damit indirekt die Wechselwirkung der unmarkierten Verbindung mit diesem Rezeptor charakterisiert werden.

5.2.1 Theoretische Grundlagen

Die zunehmende Verdrängung eines Radioliganden aus seiner spezifischen Rezeptorbindung durch steigende Inhibitorkonzentrationen kann auch aufgefaßt werden als eine zunehmende Absättigung der durch den Radioligand besetzten Rezeptoren durch den Verdränger. Die Verdrängungsfunktion ergibt sich also aus der Differenz der spezifischen Rezeptorbindung des Radioliganden in Abwesenheit des Verdrängers und der Sättigungsfunktion für den Inhibitor (siehe Sättigungsfunktion (Gleichung 9)):

$$B = B_0 - \frac{B_0 \times I}{IC_{50} + I} \quad (12)$$

- B = Konzentration an spezifisch gebundenem Radioliganden in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration
 B_0 = Konzentration an spezifisch gebundenem Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors
 I = Konzentration des Inhibitors
 IC_{50} = Inhibitorkonzentration, bei der 50% der spezifischen Bindung des Radioliganden gehemmt sind

Durch Umformung ergibt sich aus dieser Gleichung:

$$B = \frac{B_0 \times (IC_{50} + I)}{IC_{50} + I} - \frac{B_0 \times I}{IC_{50} + I}$$

$$B = \frac{B_0 \times IC_{50} + B_0 \times I - B_0 \times I}{IC_{50} + I}$$

$$\boxed{B = \frac{B_0 \times IC_{50}}{IC_{50} + I}} \quad (13)$$

Diese Gleichung stellt die allgemeine Verdrängungsfunktion unter Zugrundelegung des Massenwirkungsgesetzes dar (Abb.7.). Sie gilt unter der Voraussetzung einheitlicher univalenter Liganden und einer homogenen Rezeptorpopulation mit nichtinteragierenden Bindungsstellen.

Der IC_{50} -Wert steht dabei in enger Beziehung zur Dissoziationskonstante des Inhibitors (K_I). Diese Beziehung ist von der Konzentration (F) und der Dissoziationskonstante (K_D) des Radioliganden abhängig und wird nach Cheng und Prusoff (24) durch die Gleichung 14 beschrieben:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + F/K_D} \quad (14)$$

Dieser Term ist allerdings nur anwendbar, wenn die gebundene nur einen kleinen Prozentsatz der eingesetzten Radioligandkonzentration ausmacht (24,62).

Durch Umformung von Gleichung 14 wird die Abhängigkeit des IC_{50} -Werts eines Verdrängers von der eingesetzten Radioligandkonzentration

tration (F) deutlich:

$$IC_{50} \approx K_I \times (1 + F/K_D)$$

Ist die Konzentration des Radioliganden F genauso groß wie seine Dissoziationskonstante ($F = K_D$), so wird der Ausdruck F/K_D gleich 1 und der IC_{50} -Wert entspricht der doppelten Dissoziationskonstante des Inhibitors ($IC_{50} = 2 \times K_I$).

Für $F < K_D$ gilt $F/K_D < 1$, der IC_{50} -Wert wird also immer kleiner und nähert sich der K_I .

Für $F > K_D$ gilt $F/K_D > 1$. Dies entspricht einer zunehmenden Rechtsverschiebung der Verdrängungskurve durch steigende Radioligandkonzentrationen (Zunahme des IC_{50} -Werts).

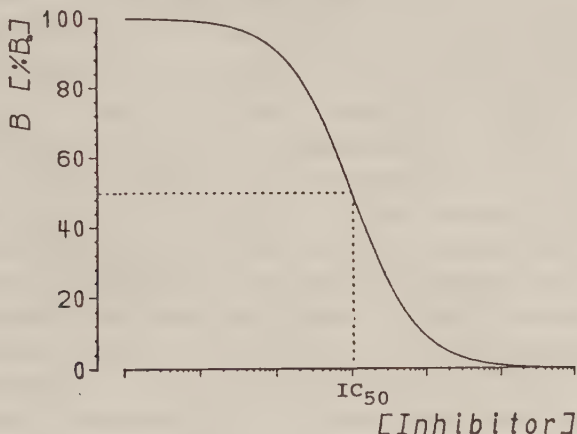


Abb. 7. Verdrängungskurve: Das zu untersuchende Gewebe wird mit einer einzigen Konzentration eines Radioliganden in Gegenwart von steigenden Konzentrationen eines kompetitiv wirkenden, unmarkierten Liganden (Inhibitor, Verdränger) äquilibriert. Bei halblogarithmischer Auftragung der Inhibitorkonzentration I gegen die für jede Inhibitorkonzentration gemessene (abnehmende) Bindung des Radioliganden in % des Ausgangswertes ohne Inhibitor ($B_0 = 100\%$) ergibt sich unter der Voraussetzung einer einheitlichen Rezeptorpopulation ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Der IC_{50} -Wert entspricht der Inhibitorkonzentration, bei der 50% der spezifischen Bindung des Radioliganden gehemmt sind.

Damit ist wiederum der einfache Fall einer homogenen Rezeptorpopulation mit nichtinteragierenden Bindungsstellen beschrieben. Sehr kompliziert werden die Zusammenhänge, wenn anhand von Verdrängungsexperimenten der Nachweis und die Charakterisierung heterogener Bindungsstellenpopulationen erfolgen soll. Dann müssen nämlich die Affinitäten sowohl des Radioliganden als auch des Inhibitors gegenüber den verschiedenen Rezeptorsubtypen, sowie deren unterschiedliche prozentuale Besetzung in Abhängigkeit von der eingesetzten Radioligandkonzentration berücksichtigt werden (59,66,76).

5.2.2. Hemmung der Bindung von (-)¹²⁵Jodocyanopindolol an menschliche Lymphozyten durch Timolol

Intakte Zellen (0.5×10^6 Zellen/500 l) wurden mit einer ¹²⁵JCYP Konzentration (16.4 pmol/l bzw. 47.3 pmol/l) und steigenden Konzentrationen des unmarkierten Inhibitors (-)-Timolol (10^{-10} - 10^{-4} pmol/l) in Einzelproben zu 0.5 ml 120 Minuten lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Die Inkubationsphase wurde durch rasche Filtration über Whatman^R GF/B Glasfaserfilter beendet. Anschließend wurden die Filter dreimal mit eiskalter physiologischer Kochsalzlösung (jeweils 3 ml) gewaschen und im Gammacounter gemessen (siehe auch 5.1.1.4. und 5.1.2.).

Die für jede Timololkonzentration gemessene (abnehmende) Bindung des Radioliganden B wurde in % der spezifischen Bindung bei der eingesetzten ¹²⁵JCYP-Konzentration ($B_0 = 100\% = \text{Bindung ohne Timolol (Gesamtbindung)} - \text{maximal durch Timolol verdrängbare Bindung (unspezifische Bindung)}$) graphisch dargestellt.

Durch Anpassung von B in Abhängigkeit von der Timololkonzentration an die allgemeine Form der Verdrängungsfunktion für eine oder mehrere voneinander unabhängige Klassen von Bindungsstellen (Gleichung 14) konnten die Bindungsparameter B_{0i} und IC_{50i} errechnet werden.

$$B = \sum_{i=1}^n \frac{B_{0i} \times IC_{50-i}}{IC_{50-i} + I} \quad (15)$$

- B = Konzentration an spezifisch gebundenem Radioliganden in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration
 B_{0i} = Konzentration des spezifisch an Bindungsstellen der Klasse i gebundenen Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors
 I = Konzentration des Inhibitors
 IC_{50-i} = Inhibitorkonzentration, bei der 50% der spezifischen Bindung des Radioliganden an Bindungsstellen der Klasse i gehemmt sind

In der Kurvenanpassung für zwei voneinander unabhängige Klassen von Bindungsstellen ($n=2$ in Gleichung 15) waren B_{01} und IC_{50-1} die Bindungsparameter für die hochaffine Bindungsstelle, während B_{02} und IC_{50-2} die niederaffine Bindungsstelle charakterisierten.

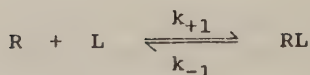
6. Kinetische Experimente

Bei den kinetischen Experimenten handelt es sich um einen zweiten Typ von Versuchen. Sie beruhen auf der Bestimmung der Bindung in Abhängigkeit von der Zeit (t). Man unterscheidet dabei entsprechend Hin- und Rückreaktion der bimolekularen Reaktion bei der Ausbildung des Rezeptor-Ligandkomplexes (siehe Gleichung 1) zwei Versuchstypen: Assoziations- und Dissoziationskinetiken.

6.1. Dissoziationskinetik

6.1.1. Theoretische Grundlagen

Aus der unter 5.1 beschriebenen Gleichung 1 für die Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes unter der Voraussetzung eines einheitlichen Liganden und einer einheitlichen, nicht interagierenden Rezeptorpopulation



lassen sich die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} ableiten nach

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1}x[R]x[L] - k_{-1}x[RL] \quad (16)$$

Danach ist die Nettobildungsgeschwindigkeit des RL-Komplexes gleich der Differenz seiner Bildungsrate (Assoziation: $k_{+1}x[R]x[L]$) und seiner Dissoziationsrate ($k_{-1}x[RL]$).

Anmerkung: Im Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation (Äquilibrium) ist die Nettobildungsgeschwindigkeit des RL-Komplexes $d[RL]/dt = 0$ (d.h. es wird pro Zeiteinheit genauso viel RL gebildet wie auch zerfällt). Also gilt dann:

$$\begin{aligned} 0 &= k_{+1}x[R]x[L] - k_{-1}x[RL] \\ \text{oder:} \quad k_{-1}x[RL] &= k_{+1}x[R]x[L] \end{aligned}$$

$$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R]x[L]}{[RL]}$$

Dieser Ausdruck entspricht folglich der Gleichung 2, die die Bildungsreaktion des RL-Komplexes unter Gleichgewichtsbedingungen beschreibt.

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{-1}) kann bestimmt werden nach Ausschaltung der Assoziation ($k_{+1}x[R]x[L] = 0$). Es handelt sich bei der dann alleine übrigbleibenden Dissoziationsreaktion um eine Reaktion erster Ordnung (18), d.h. die Dissoziationsgeschwindigkeit (=Geschwindigkeit des Zerfalls von RL) ist nur abhängig von der Konzentration des RL-Komplexes. [Im Gegensatz dazu stellt die Assoziationsreaktion eine Reaktion zweiter Ordnung dar, d.h. die Assoziationsgeschwindigkeit (=Geschwindigkeit

keit der Bildung des RL-Komplexes) hängt sowohl von der Rezeptorkonzentration [R] als auch von der Ligandkonzentration [L] ab.]

Praktisch verfährt man bei der Bestimmung von k_{-1} so, daß Radioligand und Gewebe bis zur Gleichgewichtseinstellung inkubiert werden. Die Ausschaltung der Assoziationsreaktion, die die Messung der Dissoziationskinetik ermöglicht, kann dann auf zwei Wegen erfolgen (74,86):

1. Der Inkubationsansatz wird durch Zugabe von Puffer auf das über 100-fache verdünnt. Dadurch wird die Konzentration des freien Liganden so klein, daß die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von freiem Ligand und freiem Rezeptor (Assoziation) vernachlässigbar klein wird.
2. Der zweite, in seiner praktischen Durchführung einfachere und deshalb auch häufiger gewählte Weg, besteht darin, dem Inkubationsansatz einen unmarkierten Liganden im Überschuß zuzugeben, so daß alle freien Bindungsstellen durch diesen besetzt werden. Dabei wird die Wahrscheinlichkeit, daß sich der aus seiner Bindung abdissoziierende Radioligand in einer Assoziationsreaktion erneut an den Rezeptor anlagert, sehr gering, da eine freiwerdende Rezeptorstelle sofort mit dem in weit höherer Konzentration vorliegenden unmarkierten Liganden besetzt wird.

In beiden Fällen werden dann die zeitabhängig sinkenden Mengen an spezifisch gebundenem Radioliganden bestimmt.

Für die auf diese Weise meßbar gewordene Dissoziationsreaktion läßt sich aus Gleichung 16 eine mathematische Beziehung ableiten:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} \times [R] \times [L] - k_{-1} \times [RL]$$

Da die Assoziationsreaktion gehemmt ist ($k_{+1} \times [R] \times [L] = 0$), folgt:

$$\frac{d[RL]}{dt} = -k_{-1} \times [RL]$$

Wenn zur Zeit Null ($t=0$), d.h. zu Beginn der Dissoziationskinetik, $[RL]_0$ Rezeptor-Ligand-Komplexe vorhanden sind, so gilt für die noch nicht dissoziierten RL-Komplexe zur Zeit t $[RL]_t$:

$$[RL]_t = [RL]_0 \times e^{-k_{-1} \times t} \quad (17)$$

oder in der für Rezeptorbindungsstudien üblichen Nomenklatur (siehe B.5.1.1.):

$$B_t = B_0 \times e^{-k_{-1} \times t} \quad (18)$$

B_0 = Konzentration des zu Beginn der Dissoziation ($t=0$) spezifisch gebundenen Liganden
 t = Zeit nach dem Starten der Dissoziationsreaktion
 B_t = Konzentration des zur Zeit t spezifisch gebundenen Liganden
 k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Diese Gleichung stellt die allgemeine Dissoziationsfunktion dar (Abb.8.A; (62)). Sie ist typisch für Geschwindigkeitsreaktionen erster Ordnung (worum es sich z.B. auch beim Zerfall eines radioaktiven Nuklids handelt; Gleichung 18 ist dem radioaktiven Zerfallsgesetz äquivalent).

Durch Logarithmieren und Auflösen nach dem Exponenten kann diese Exponentialfunktion in eine lineare Form transformiert werden:

$$B_t = B_0 \times e^{-k_{-1} \times t}$$

$$\frac{B_t}{B_0} = e^{-k_{-1} \times t}$$

$$\ln \frac{B_t}{B_0} = -k_{-1} \times t \quad (19)$$

Dieser Ausdruck entspricht einer Geradengleichung ($y = -ax$). Durch Auftragung der Zeit t gegen $\ln B_t/B_0$ (=halblogarithmische Auftragung) erhält man also eine lineare Beziehung für das Dissoziationsverhalten des Liganden (Abb.8.B). Die Steigung dieser Geraden ergibt den negativen Wert der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} .

Die Halbwertszeit der Dissoziationsreaktion $t_{1/2}$, also die Zeit nach der noch 50% des Radioliganden spezifisch gebunden sind (bezogen auf die zu Beginn der Dissoziation spezifisch gebundene Menge des Radioliganden B_0), läßt sich dabei entweder graphisch (siehe Abb. 8.) oder rechnerisch ermitteln:

Zur Zeit $t_{1/2}$ gilt $B_t = \frac{1}{2} B_0$

Durch Einsetzen dieses Terms in Gleichung 15 und Umformung erhält man:

$$\begin{aligned} \frac{1}{2} B_0 &= B_0 \times e^{-k_{-1} x t_{1/2}} \\ \frac{1}{2} &= e^{-k_{-1} x t_{1/2}} \\ \ln \frac{1}{2} &= -k_{-1} x t_{1/2} \\ -\ln 2 &= -k_{-1} x t_{1/2} \end{aligned}$$

$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} = \frac{0.693}{k_{-1}}$	(20)
---	------

Damit ist wiederum der einfache Fall einer homogenen Rezeptorpopulation mit nicht interagierenden Bindungsstellen (lineare Dissoziationskinetik bei halblogarithmischer Auftragung) beschrieben. Häufig ergeben sich dabei jedoch von einer Geraden abweichende Kurvenverläufe. Dies kann auf dem Vorhandensein mehrerer voneinander unabhängiger Klassen von Bindungsstellen, auf Isomerisierungs- oder kooperative Effekte oder auf einem uneinheitlichen Liganden (z.B. verschiedene Stereoisomere) beruhen (62).

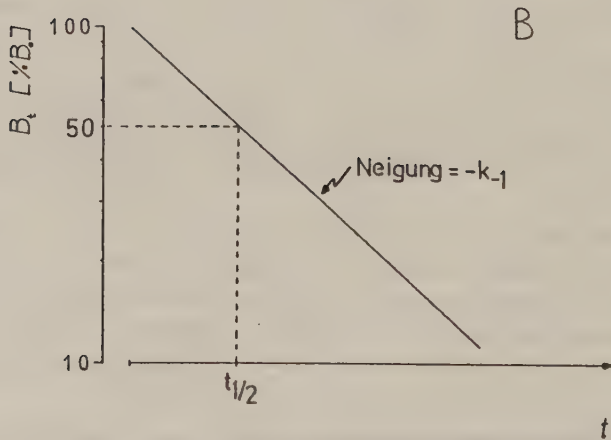
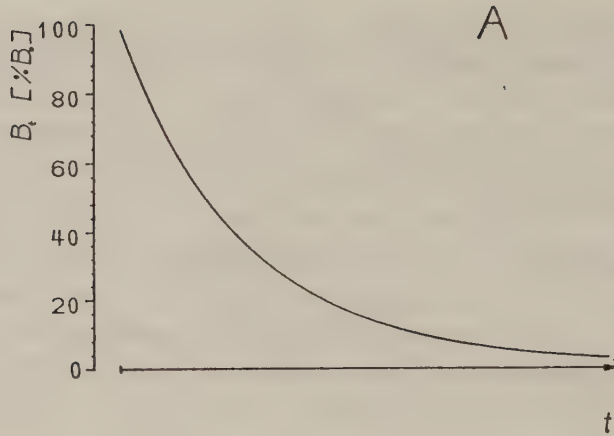


Abb. 8. Dissoziationskinetik: A: Prozentuale Auftragung der zur Zeit t nach Starten der Dissoziationsreaktion spezifisch gebundenen Menge eines Radioliganden B_t bezogen auf die spezifische Bindung zu Beginn der Dissoziation ($B_0 = 100\%$). Man sieht dabei den Verlauf einer exponentiell abklingenden Funktion (Geschwindigkeitsreaktion erster Ordnung). B: Durch halblogarithmische Auftragung dieser Funktion erhält man unter der Voraussetzung einer homogenen Rezeptorpopulation eine Gerade, aus deren Neigung ($-k_{-1}$) die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} berechnet werden kann. Der Schnittpunkt des Lots von dem Punkt der Kurve, bei dem noch 50% des Radioliganden spezifisch gebunden sind, mit der Abszisse ergibt die Halbwertszeit der Dissoziationsreaktion $t_{1/2}$.

6.1.2. Dissoziationskinetik für (-)- 125 Jodocyanopindolol an menschlichen Lymphozyten

Zunächst wurden intakte Lymphozyten (10^6 Zellen/ml), bzw. Lymphozytenmembranen (10^6 zerschlagene Zellen/ml) mit einer bestimmten 125 JCYP Konzentration (29.1 pmol/l in den Versuchen an intakten Zellen, 4.1 pmol/l in den Versuchen an Membranen) durch Inkubation im Wasserbad bei 37°C äquilibriert (120 Minuten).

Die spezifische Bindung bei dieser 125 JCYP Konzentration wurde, wie unter 5.2. beschrieben, aus der Differenz der Bindung von parallelen Inkubationen in Einzelproben zu 0.5ml in Abwesenheit (Gesamtbinding = Summe aus spezifischer und unspezifischer Bindung) und in Anwesenheit des unmarkierten Liganden (-)-Timolol (10^{-6} mol/l; unspezifische Bindung) bestimmt.

Nach der Äquilibrierungsphase mußte dann zur Messung der Dissoziationsreaktion die Assoziationsreaktion ausgeschaltet werden. Dies wurde erreicht, indem 500 µl Aliquote der mit 125 JCYP äquilibrierten Zell-, bzw. Membransuspension auf in PPN-Röhrchen (4ml) vorgelegte 10 µl Aliquote des unmarkierten Liganden Timolol (10^{-6} mol/l Endkonzentration im Ansatz) verteilt wurden.

Diese Einzelproben wurden weiterhin bei 37°C inkubiert. Nach definierten Zeitabständen (zwischen 0 und 300 Minuten) wurde die Reaktion durch rasche Filtration über Whatman GF/B Filter gestoppt (Trennung des gebundenen vom freien Liganden, siehe auch B.5.1.1.4.). Die Filter wurden anschließend, wie unter B.5.1.2. beschrieben, gewaschen und im Gammacounter gemessen.

Durch Anpassung der zeitabhängig sinkenden Menge an spezifisch gebundenem 125 JCYP an die allgemeine Form der Dissoziationsfunktion für eine oder mehrere Klassen voneinander unabhängiger Bindungsstellen (Gleichung 18) konnten die Bindungsparameter B_{0i} und k_{-i} berechnet werden (62):

$$B_t = \sum_{i=1}^n B_{0i} \times e^{-k_{-i} t} \quad (21)$$

- B_{0i} = Konzentration des zu Beginn der Dissoziation ($t=0$) spezifisch an Bindungsstellen der Klasse i gebundenen Liganden
 t = Zeit nach dem Starten der Dissoziationsreaktion (entspricht der Zeit ab der Zugabe von 10^{-6} mol/l Timolol)
 B_t = Konzentration des zur Zeit t spezifisch gebundenen Liganden
 k_{-i} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von Bindungsstellen der Klasse i

In der Kurvenanpassung für zwei voneinander unabhängige Klassen von Bindungsstellen ($n=2$ in Gleichung 21) waren B_{01} und k_{-1} die Bindungsparameter für die hochaffine Bindungsstelle, während B_{02} und k_{-2} die niederaffine Bindungsstelle charakterisierten.

6.2. Assoziationskinetik

6.2.1. Theoretische Grundlagen

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante wird ermittelt, indem man die (zunehmende) spezifische Bindung in Abhängigkeit von der Zeit nach Mischung eines Radioliganden mit Rezeptoren tragenden Gewebe mißt (Abb.9.).

Wie schon in Abschnitt B.6.1.1. erwähnt, handelt es sich bei der Assoziationsreaktion im Gegensatz zur Dissoziationsreaktion um eine Reaktion zweiter Ordnung (17), d.h. die Assoziationsgeschwindigkeit (=Geschwindigkeit der Bildung des RL-Komplexes) hängt sowohl von der Rezeptorkonzentration $[R]$ als auch von der Ligandkonzentration $[L]$ ab. Außerdem kann die gleichzeitig ablaufende Rückreaktion, in diesem Falle also die Dissoziationsreaktion, nicht ausgeschaltet werden. Sie muß mit zunehmender Ausbildung von RL-Komplexen mitberücksichtigt werden. Die Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstante ist deshalb wesentlich komplizierter als die Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante. Für die Berechnung von k_{+1} gibt es zwei mögliche

Wege (8,38,60):

a) Behandlung der Assoziation als Reaktion zweiter Ordnung

Um die Rückreaktion (Dissoziation: $k_{-1} \times [RL]$) vernachlässigen zu können wird nur die Anfangsgeschwindigkeit der Bindung berücksichtigt, das heißt die Konzentration der bereits gebildeten Rezeptor-Ligandkomplexe $[RL]$ ist so klein, daß $k_{-1} \times [RL]$ nahezu 0 wird.

Auf diese Weise läßt sich aus Gleichung 16 eine mathematische Beziehung für die Assoziationsreaktion ableiten:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} \times [R] \times [L] - k_{-1} \times [RL] \quad (16)$$

Da die Dissoziationsreaktion vernachlässigt wird ($k_{+1} \times [R] \times [L] = 0$), folgt:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} \times [R] \times [L] \quad (21)$$

Dabei muß berücksichtigt werden, daß die totale Rezeptorkonzentration $[R_T]$ ($=B_{\max}$) sich aus der freien Rezeptorkonzentration $[R]$ und der der Konzentration der im RL-Komplex gebundenen Rezeptoren ($=B$) zusammensetzt:

$$[R_T] = [R] + [RL] \text{ oder } [R] = [R_T] - [RL] \text{ oder } [R] = B_{\max} - B \quad (22)$$

Ebenso setzt sich die gesamte Ligandkonzentration $[L_T]$ aus der freien ($[L]=F$) und der im RL-Komplex gebundenen Ligandkonzentration zusammen:

$$[L_T] = [L] + [RL] \text{ oder } [L] = [L_T] - [RL] \text{ oder } [L] = L_T - B \quad (23)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 22 und Gleichung 23 in Gleichung 21 ergibt sich:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} \times (B_{\max} - B) \times ([L_T] - B)$$

Durch Integration erhält man dann:

$$k_{+1} = \frac{1}{t \times ([L_T] - B_{\max})} \times \ln \frac{B_{\max} \times ([L_T] - B)}{[L_T] \times (B_{\max} - B)} \quad (24)$$

Somit kann k_{+1} zu jeder Zeit t kurz nach Starten der Assoziationskinetik (also kurz nach Mischung des Radioliganden mit den Rezeptoren tragenden Gewebe), bei der B gemessen wurde, berechnet werden. Der wesentliche Nachteil dieser Methode ist, daß sie stets eine unabhängige, zusätzliche Bestimmung von $B_{\max}$ in einem separaten Sättigungsexperiment voraussetzt. Fehler bei der $B_{\max}$ -Bestimmung gehen dabei in die Berechnung von k_{+1} ein. Deshalb bevorzugt man meist eine andere Methode zur Bestimmung von k_{+1} :

b) Behandlung der Assoziation als Reaktion pseudo-erster Ordnung

Hierbei wird die Rückreaktion mitberücksichtigt (Dissoziation $k_{-1} \times [RL]$ ungleich 0), jedoch die Konstanz der Radioligandkonzentration vorausgesetzt ($L_T = F$). Dies ist aber nur zulässig, wenn die Konzentration des freien Radioliganden wesentlich größer als die des gebundenen ist ($B < 10\% L_T$).

Wird L_T als konstant vorausgesetzt, so kann die Assoziation als Reaktion pseudoerster Ordnung aufgefaßt werden, weil die Assoziationsgeschwindigkeit dann nur noch von B_0 , der Konzentration des im Gleichgewicht gebundenen Radioliganden abhängt. Es gilt dann:

$$B = B_0 \times (1 - e^{-k_{\text{obs}} t}) \quad (25)$$

Aus der durch Anpassung der Bindungsdaten an diese Funktion erhaltenen Geschwindigkeitskonstante k_{obs} (observed association rate constant) kann bei bekannter Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} berechnet werden:

$$k_{+1} = \frac{k_{\text{obs}} - k_{-1}}{[L_T]} \quad (26)$$

Auf die genaue Ableitung dieser Gleichung soll hier verzichtet werden. Diese Methode benötigt zwar die unabhängige Bestimmung von k_{-1} . Dies ist aber in der Regel mit größerer Genauigkeit möglich als die Bestimmung der B_{max} (geringe interindividuelle Schwankungen, daher Mittelung mehrerer Versuchsergebnisse möglich).

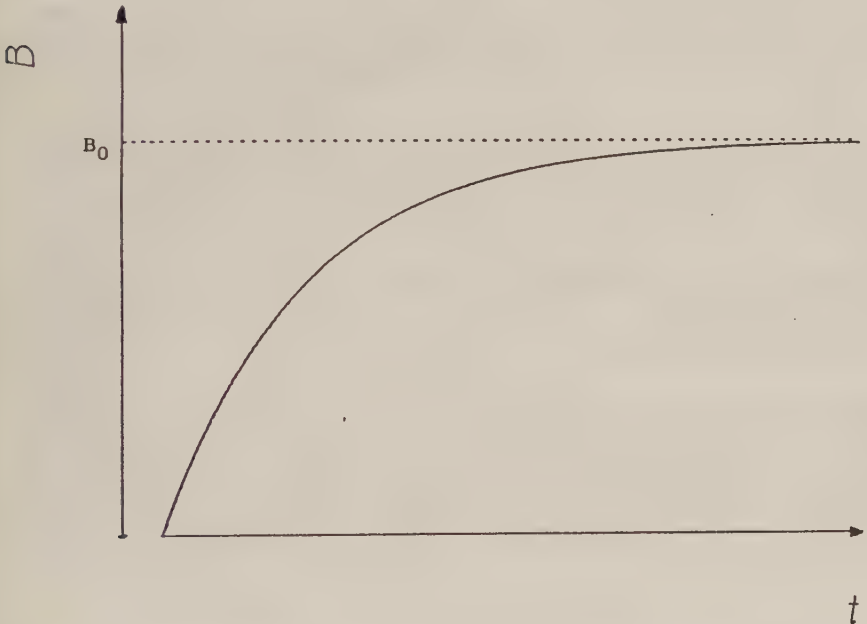


Abb. 9. Assoziationskinetik: Auftragung der zeitabhängig zunehmenden spezifischen Bindung B eines Radioliganden an Rezeptoren tragendes Material gegen die Zeit t nach Mischung des Liganden mit dem Gewebe. Die zunehmende Abflachung der Kurve entspricht einer mit steigendem Besetzungszustand der Rezeptoren immer stärker ins Gewicht fallenden Dissoziation des Liganden von bereits besetzten Rezeptoren, die der Assoziationsreaktion entgegenwirkt. Das Bindungsplateau (B_0) entspricht dem Erreichen eines Gleichgewichts zwischen Assoziations- und Dissoziationsreaktion des Liganden (Äquilibrium).

6.2.2. Assoziationskinetik für (-)- 125 Jodocyanopindolol an menschlichen Lymphozyten

Die Assoziationskinetik wurde an intakten Lymphozyten (10^6 Zellen/ml) mit einer 125 JCYP Konzentration von 2.1 pmol/l in Einzelproben zu 0.5 ml (HH-Puffer) bei einer Inkubationstemperatur von 37°C durchgeführt.

Die spezifische Bindung bei dieser 125 JCYP Konzentration wurde, wie unter B.5.2. beschrieben, aus der Differenz der Bindung von in Abwesenheit (Gesamtbindung = Summe aus spezifischer und unspezifischer Bindung) und in Anwesenheit des unmarkierten Liganden (-)-Timolol (10^{-6} mol/l; unspezifische Bindung) bestimmt.

Die Assoziationsreaktion wurde durch Zugabe von 100 l-Aliquoten der Zellsuspension (siehe B.3.) gestartet. Nach definierten Zeitabständen (zwischen 0 und 120 Minuten) wurde die Reaktion durch rasche Filtration über Whatman GF/B Filter gestoppt (Trennung des gebundenen vom freien Liganden, siehe auch B.5.1.4.). Die Filter wurden anschließend, wie unter B.5.2. beschrieben, gewaschen und im Gammacounter gemessen.

Durch Anpassung der zeitabhängig zunehmenden Menge an spezifisch gebundenem 125 JCYP an die Assoziationsfunktion (Gleichung 25; B.6.2.1., Methode b) konnten die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} und anhand Gleichung 26 die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten berechnet werden.

7. Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit verwerteten Daten aus Bindungsexperimenten stellen Mittelwerte aus eng korrelierenden Doppel- oder Dreifachbestimmungen dar. Für die Auswertung der Meßergebnisse stand ein Commodore-Rechner (Modell 3032) zur Verfügung, der zur Datener-

fassung und -aufbereitung und zur Steuerung eines XY-Plotters der Firma Watanabe (Modell WX 4671) für die graphische Darstellung verwendet wurde.

Die Bindungsparameter wurden durch Anpassung der unter B.5. und B.7. besprochenen Gleichungssysteme an die experimentellen Bindungsdaten mit dem Gauss-Newtonschen Iterationsverfahren nach Hartley berechnet. Dabei wurde ein Computerprogramm (MULTI), das von Kiyoshi Yamaoka et al. (89) entwickelt wurde, angewandt.

Das Prinzip der iterativen nichtlinearen Kurvenanpassung besteht darin, daß aufgrund initialer Parametervorgaben (Schätzwerte) eine theoretische Kurve erstellt wird. Die Abweichungen der experimentellen Daten von dieser Kurve werden in der Summe der Abweichungsquadrate ausgedrückt. Dementsprechend werden in den nun folgenden Iterationsschritten die Parameter so verändert, daß eine immer bessere Anpassung an die vorhandenen Daten, ausgedrückt in der Senkung der Summe der Abweichungsquadrate, erreicht wird.

Als Maß für die Güte der Kurvenanpassung wurde die Abweichungsquadratsumme sowie Akaikes Informationskriterium (AIC; (89)) verwendet. Der Vorteil von AIC liegt darin, daß es die Anzahl der anzupassenden Parameter mitberücksichtigt.

Die statistische Signifikanz der angepaßten Parameter ($P = B_{\max i}$, K_{Di} , B_{0i} und k_{-i}) gegen Null wurde mittels des z-Testes ($H_0: P=0$; (34,78)) ermittelt. Der Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde mit dem t-Test nach Student durchgeführt (34,78). $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen.

C. ERGEBNISSE

1. Sättigungsexperimente mit $(-)^{125}\text{Jodocyanopindolol}$ an menschlichen Lymphozyten

Sättigungsexperimente mit $^{125}\text{JCYP}$ über einen weiten Konzentrationsbereich (1.5 - 600 pmol/l) ergaben an Lymphozytenmembranen sowie an intakten Lymphozyten (Abb.10 und Abb.12) nicht-lineare Kurvenverläufe in der Auftragung nach Scatchard (Abb.11 und Abb.13).

Eine gute Kurvenanpassung wurde erreicht unter der Annahme von zwei sättigbaren Bindungsstellen für $^{125}\text{JCYP}$, einer hoch- und einer niederaffinen Bindungsstelle ($n=2$ in Gleichung 11; siehe auch B.5.). Der nach unten gebogene konkave Kurve im Scatchard-Plot kann dabei als eine aus zwei Geraden unterschiedlicher Steigung zusammengesetzte Funktion beschrieben werden. Die steil verlaufende Gerade repräsentiert hochaffine Bindungsstellen mit den Bindungsparametern $B_{\text{max}1}$ (Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse) und K_{d1} (Neigung der Geraden $= -1/K_d$, siehe auch B.5.1.1.2.) Die flache Gerade entspricht der niederaffinen Bindungsstellenklasse mit den Bindungsparametern $B_{\text{max}2}$ und K_{d2} . Tabelle 2 gibt eine Übersicht der gemittelten Parameter aus den Versuchen an intakten Lymphozyten und Lymphozytenmembranen.

Die Bindungsparameter zur Charakterisierung der niederaffinen Bindungsstelle intakter Lymphozyten unterschieden sich nicht signifikant von den Parametern der niederaffinen Bindungsstelle auf Membranen ($p > 0.05$ im t-Test; siehe auch B. 7.). Dagegen war die Dichte hochaffiner Bindungsstellen ($B_{\text{max}1}$) auf intakten Zellen etwa doppelt so hoch wie auf Membranen ($p < 0.05$) während K_{D1} (Gleichgewichtsdissoziationskonstante hochaffiner Bindungsstellen) an intakten Zellen etwa die Hälfte des Werts betrug, der an Membranen meßbar war ($p < 0.05$; Tabelle 2).

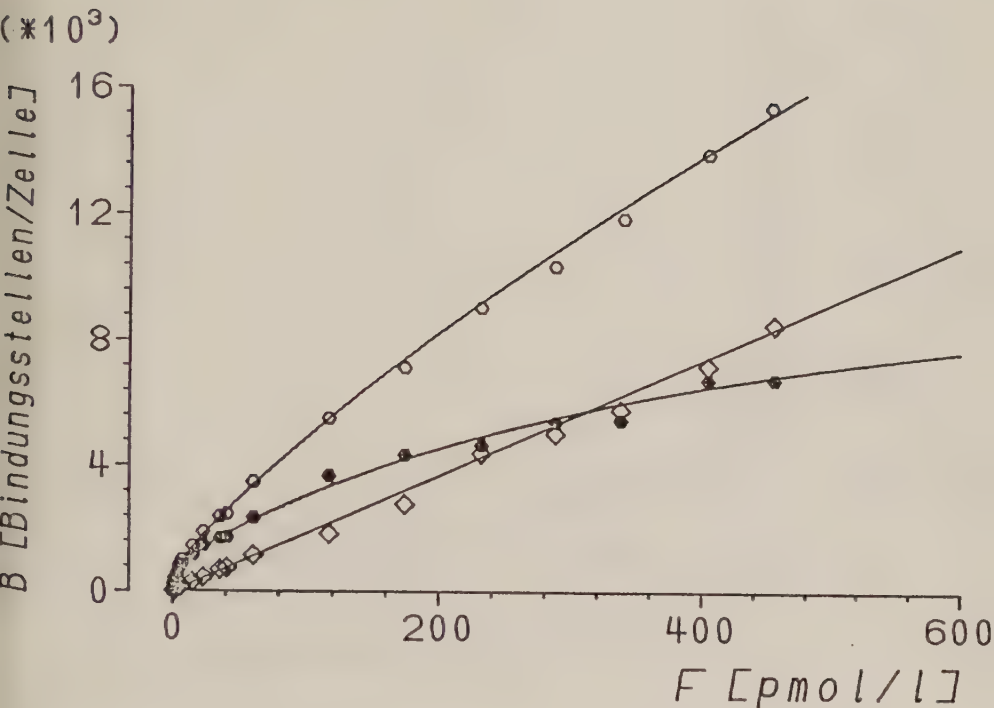


Abb.10. Sättigungsexperimente mit $^{125}\text{JCYP}$ an intakten Lymphozyten über einen weiten Konzentrationsbereich des Radioliganden: Intakte Lymphozyten (0.5×10^6 Zellen/500 l) wurden mit 17 Konzentrationen $^{125}\text{JCYP}$ zwischen 1.5 und 600 pmol/l (F) 120 Minuten lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die unspezifische Bindung des Radioliganden wurde in Gegenwart von 10^{-6} mol/l Timolol bestimmt. Die Inkubationen wurden durch rasche Filtration beendet (siehe auch B.5.). Anschließend wurden die Filter im Gammacounter gemessen (o-o: Gesamtbindung; o-o: unspezifische Bindung). Die spezifische $^{125}\text{JCYP}$ -Bindung (o-o) wurde durch Subtraktion der unspezifischen von der Gesamtbindung ermittelt.

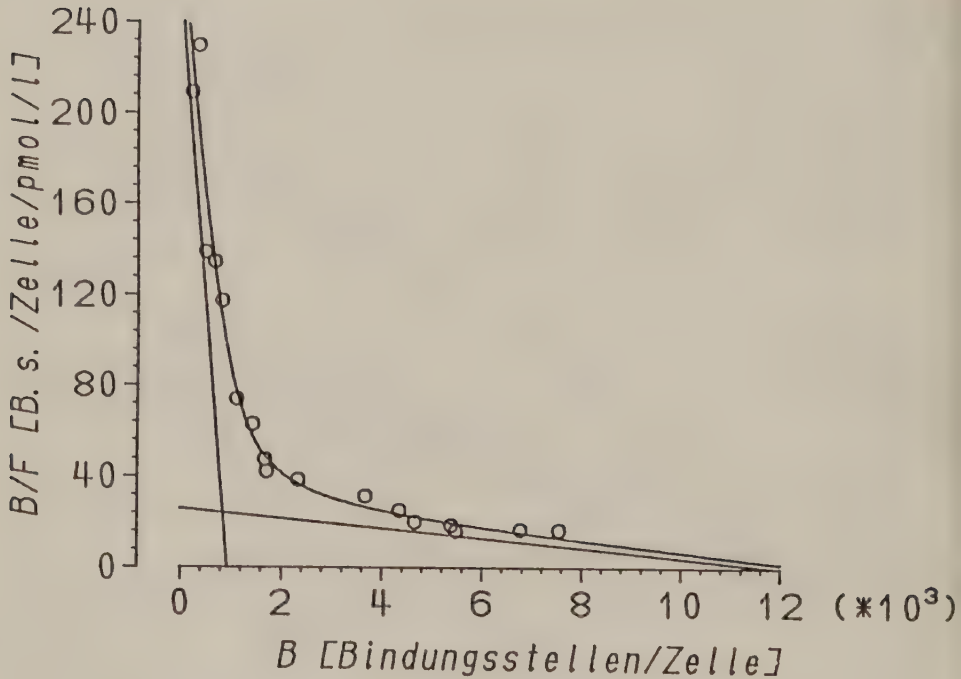


Abb.11. Auftragung der spezifischen Bindung aus Abb.10 nach Scatchard: Es ergaben gebogene, nach unten konkave Kurvenverläufe. Sie wurde nach Gleichung 11 für zwei voneinander unabhängige Klassen von Bindungsstellen ($n=2$) angepaßt. Dabei repräsentiert der erste, steile Kurvenabschnitt des Scatchard-Plots die hochaffine Bindungsstelle mit den Bindungsparametern $B_{\max 1}$ und K_{d1} , während der zweite flache Kurvenabschnitt der niederaffinen Bindungsstelle mit den Parametern $B_{\max 2}$ und K_{d2} entspricht. Abgebildet ist ein typisches Sättigungsexperiment ($B_{\max 1}=940 \pm 150$ Bindungsstellen/Zelle; $K_{D1}=3.8 \pm 0.9$ pmol/l; $B_{\max 2}=11990 \pm 2440$ Bindungsstellen/Zelle; $K_{D2}=460 \pm 160$ pmol/l).

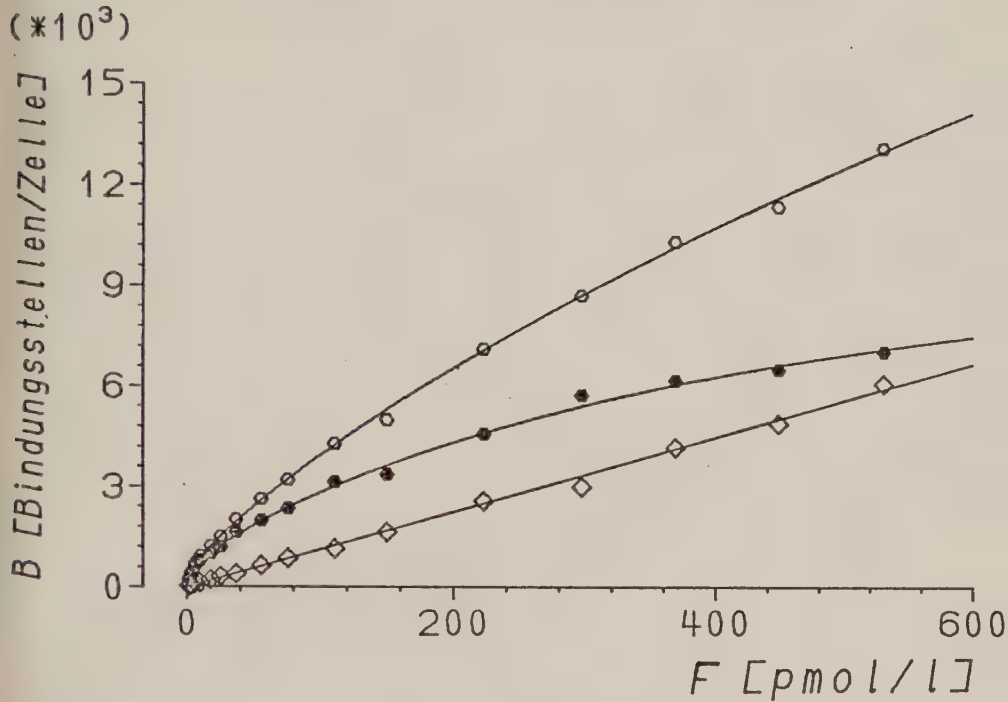


Abb.12. Sättigungsexperimente an Lymphozytenmembranen über einen weiten $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentrationsbereich: Die Versuche wurden wie in Abb.10 beschrieben mit 16 Konzentrationen $^{125}\text{JCYP}$ zwischen 1.5 und 600 pmol/l an Lymphozytenmembranen (0.5×10^6 zerschlagene Zellen/ $500 \mu\text{l}$) durchgeführt (o-o: Gesamtbindung; o-o: unspezifische Bindung; •-•: spezifische Bindung). Abgebildet ist ein typisches Sättigungsexperiment.

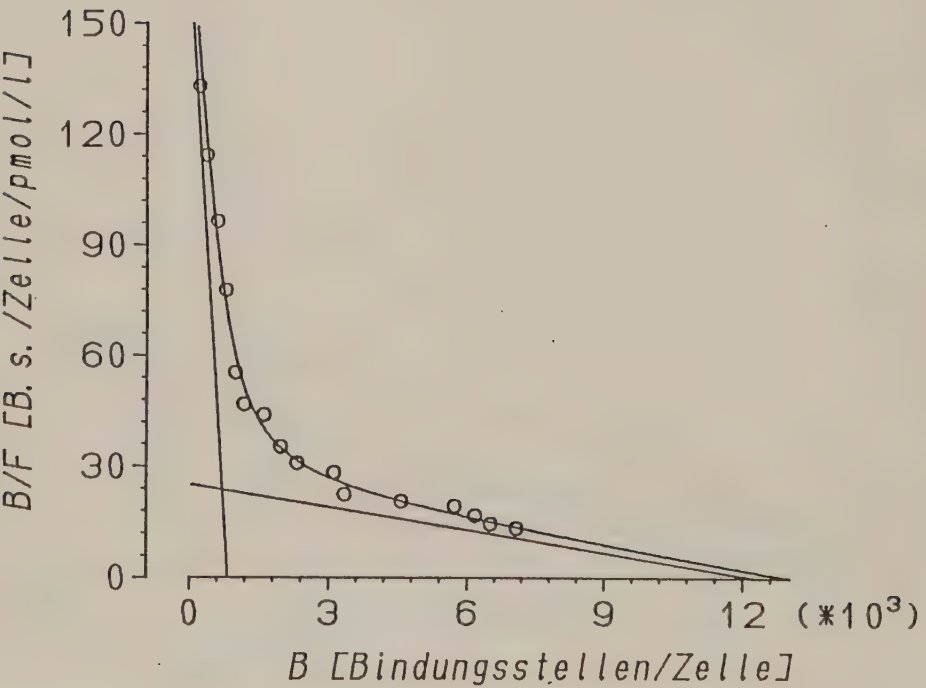


Abb.13. Auftragung der spezifischen Bindung aus Abb.12 nach Scatchard. Angepaßte Bindungsparameter der hoch- und nieder-affinen Bindungsstelle: $B_{\max 1}=770\pm 160$ Bindungsstellen/Zelle; $K_{D1}=5.1\pm 1.8$ pmol/l; $B_{\max 2}=10830\pm 1850$ Bindungsstellen/Zelle; $K_{D2}=420\pm 130$ pmol/l (siehe auch Abb.11).

Tab.2. Vergleich der Bindungsparameter aus Sättigungsversuchen und Dissoziationskinetiken an intakten Lymphozyten und Lymphozytenmembranen. Angegeben sind die arithmetischen Mittelwerte aus n Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

	Hochaffine Bindungsstelle			Niederaffine Bindungsstelle		
	$B_{\max 1}$ (B.s./ Zelle)	K_{d1} (pmol/l)	k_{-1} ($\times 10^{-3}$ min^{-1})	$B_{\max 2}$ (B.s./ Zelle)	K_{d2} (pmol/l)	k_{-2} ($\times 10^{-3}$ min^{-1})
Intakte Zellen	1000 $\pm$ 400 (n=11)	2.1 $\pm$ 0.9 (n=11)	0.5 $\pm$ 0.2 (n=6)	9150 $\pm$ 3590 (n=11)	440 $\pm$ 50 (n=3)	80 $\pm$ 20 (n=9)
Membranen	550 $\pm$ 190 (n=3)	4.1 $\pm$ 0.9 (n=3)	1.0 $\pm$ 0.1 (n=6)	11560 $\pm$ 4690 (n=3)	410 $\pm$ 70 (n=3)	60 $\pm$ 10 (n=6)

$B_{\max 1}$ = Anzahl hochaffiner Bindungsstellen (B.s.) pro Zelle

$B_{\max 2}$ = Anzahl niederaffiner Bindungsstellen pro Zelle

K_{d1} = Gleichgewichtsdissoziationskonstante der hochaffinen Bindungsstellen

K_{d2} = Gleichgewichtsdissoziationskonstante der niederaffinen Bindungsstellen

k_{-1} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der hochaffinen Bindung des Radioliganden

k_{-2} = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der niederaffinen Bindung des Radioliganden

2. Hemmung der spezifischen Bindung von (-)-¹²⁵Jodocyanopindolol an menschliche Lymphozyten durch Timolol

Die Hemmungsexperimente ergaben eine zweistufige Verdrängung der Bindung von ¹²⁵JCYP an intakte Lymphozyten durch den unmarkierten Liganden Timolol (Abb.14). Kurvenanpassungen unter der Annahme von zwei Rezeptorsubtypen (n=2 in Gleichung 15) waren in allen Versuchen besser (niedrigeres AIC; siehe B.7.) als die Anpassung an ein 1-Rezeptormodell.

Die anhand der Stufenhöhe berechnete anteilmäßige Besetzung beider Klassen von Bindungsstellen (B_{01} und B_{02}) änderte sich in Abhängigkeit von der eingesetzten ¹²⁵JCYP-Konzentration. Sie war in guter Übereinstimmung mit der aus den Sättigungsexperimenten be-

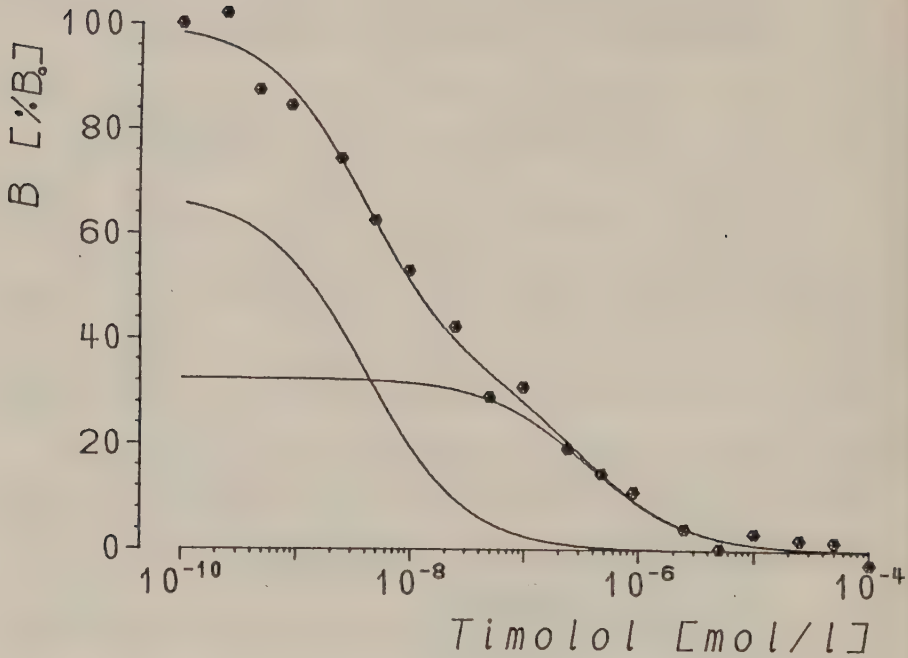


Abb. 14. Hemmung der $^{125}\text{JCYP}$ -Bindung durch Timolol: Intakte Lymphozyten (0.5×10^6 Zellen/500 μl) wurden bei einer bestimmten $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration (16.4 pmol/l) mit steigenden Konzentrationen (10^{-10} – 10^{-4} mol/l) des unmarkierten Liganden (-)-Timolol inkubiert (120 Minuten, 37°C). Die mit steigenden Timololkonzentrationen abnehmende $^{125}\text{JCYP}$ -Bindung wurde für ein Modell mit zwei unterschiedlichen Bindungsstellen angepaßt ($n=2$ in Gleichung 15; Tab.3). Abgebildet ist eine logarithmische Auftragung der Timololkonzentration gegen die $^{125}\text{JCYP}$ -Bindung (prozentuale Auftragung bezogen auf die maximal durch Timolol verdrängbare $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration $B_0=100\%$). Mit eingezeichnet ist die aus den berechneten Bindungsparametern rekonstruierte Verdrängung aus jeweils nur einer der beiden Bindungsstellen (die eingezeichnete, an die Bindungsdaten angepaßte Kurve setzt sich aus der Summe dieser zwei Kurven zusammen).

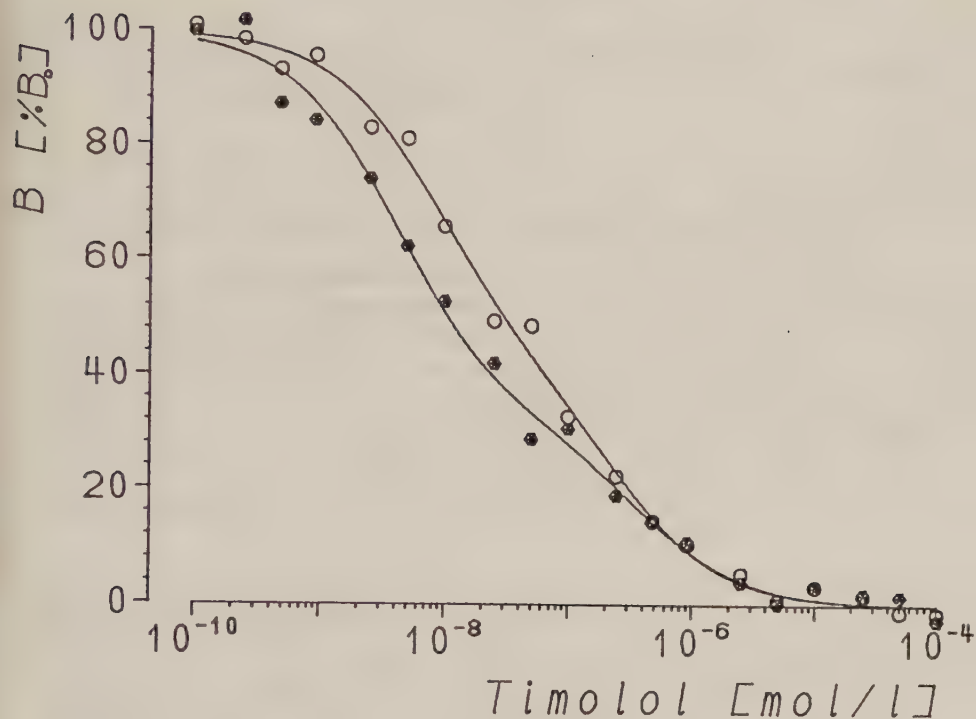


Abb.15. Vergleich von Verdrängungsexperimenten mit verschiedenen $^{125}JCYP$ -Konzentrationen: Die Versuche wurden mit zwei $^{125}JCYP$ -Konzentrationen (●=16.4 pmol/l; ○= 47.3 pmol/l) wie in Abb.14 beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Die angepaßten Bindungsparameter sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Eine Erhöhung der $^{125}JCYP$ -Konzentration führte zu einer Abnahme von B_{01} (entspricht einer Verlagerung der Stufe nach oben) und einer Rechtsverschiebung der IC_{50-1} , während die IC_{50-2} sich kaum veränderte.

Tab. 3. Abhängigkeit der Bindungsparameter aus Verdrängungsexperimenten mit Timolol von der $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration, bei der sie durchgeführt wurden. Angegeben sind die nach Gleichung 15 berechneten Parameter $\pm$ Standardabweichung.

F	B_1	B_{01}	IC_{50-1}	K_{I1}	IC_{50-2}	K_{I2}
(pmol/l)	(%B)	(%)	($\times 10^{-9}$ mol/l)		($\times 10^{-9}$ mol/l)	
16.4	72.9	67.6 $\pm$ 4.2	4.1 $\pm$ 1.0	0.47 $\pm$ 0.11	360 $\pm$ 130	340 $\pm$ 120
47.3	51.9	57.1 $\pm$ 6.1	8.1 $\pm$ 0.4	0.35 $\pm$ 0.02	290 $\pm$ 80	280 $\pm$ 80

F = $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration, bei der das Verdrängungsexperiment durchgeführt wurde

B_{01} = Anteil hochaffiner Bindung im Verdrängungsexperiment

B_{02} = 100% - B_{01} = Anteil niederaffiner Bindung im Verdrängungsexperiment (100% = maximal verdrängbare $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration)

B_1 = Anteil hochaffiner Bindung im Sättigungsexperiment (Abb. 12) berechnet nach Gleichung 15.

IC_{50} = Timololkonzentration bei der 50% der spezifischen $^{125}\text{JCYP}$ -Bindung an hochaffine (IC_{50-1}), bzw. niederaffine Bindungsstellen (IC_{50-2}) gehemmt sind

K_I = Die aus den IC_{50} -Werten nach Gleichung 14 berechneten Dissoziationskonstanten des Inhibitors (Timolol)

rechneten prozentualen Besetzung beider Bindungsstellenklassen bei derselben $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration (Tabelle 3).

Die Stufenbildung war bei niedrigen $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentrationen deutlich ausgeprägt. Höhere $^{126}\text{JCYP}$ -Konzentrationen führten dagegen zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der IC_{50-1} , während die IC_{50-2} sich kaum veränderte, so daß es zu einer zunehmenden Verschmelzung der beiden Stufen kam (Abb. 15).

Diese Veränderungen der B_0 - und IC_{50} -Werte in Abhängigkeit von der Radioligandkonzentration, bei der ein Verdrängungsexperiment durchgeführt wird, entsprechen nach Richardson und Howlett (76) einem 2-Bindungsstellenmodell, in dem sowohl der Radioligand als auch der Inhibitor mit gleichsinniger Selektivität zwischen bei-

den Klassen von Bindungsstellen unterscheiden. Mittels der Beziehung nach Cheng und Prusoff (siehe auch B.5.2.1.) konnten die Dissoziationskonstanten des Inhibitors Timolol berechnet werden.

3. Dissoziationskinetiken für (-)¹²⁵Jodocyanopindolol an menschlichen Lymphozyten

Die Dissoziation von ¹²⁵JCYP von intakten Lymphozyten sowie von Lymphozytenmembranen war biphasisch. Sie setzte sich zusammen aus der schnellen Dissoziation aus einem niederaffinen Bindungszustand des Radioliganden, die vor allem durch den ersten, steilen Abschnitt der Dissoziationskinetik (halblogarithmische Auftragung, siehe B.6.1) repräsentiert wird und der langsamen Dissoziation aus einem hochaffinen ¹²⁵JCYP-Bindungszustand, die vor allem durch den zweiten, flachen Abschnitt der Kinetik dargestellt wird. Eine gute Kurvenanpassung wurde erzielt für ein Modell zweier voneinander unabhängiger Klassen von Bindungsstellen (n=2 in Gleichung 21).

An intakten Lymphozyten wurden Kinetiken nach Äquilibration mit verschiedenen ¹²⁵JCYP-Konzentrationen gestartet (Abb.16). Dabei wurde eine biphasische Dissoziation in allen Experimenten beobachtet. Der prozentuale Anteil hochaffiner Bindung zu Beginn der Dissoziation, also nach Äquilibration bei einer bestimmten ¹²⁵JCYP-Konzentration (B_{01}) nahm mit steigenden ¹²⁵JCYP-Konzentrationen ab (Tabelle 4). Er war in guter Übereinstimmung mit dem aus den Sättigungsexperimenten abgeschätzten anteilmäßigen Besetzungszustand bei derselben ¹²⁵JCYP-Konzentration (B_1). Die prozentuale Besetzung der niederaffinen Bindungsstelle (B_{02} in den Dissoziationskinetiken, bzw. B_2 in den Sättigungsexperimenten) verhielt sich dabei entsprechend der Beziehung $B_{01}+B_{02}=100\%$, bzw. $B_1+B_2=100\%$. Beide Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1} und k_{-2}) waren unabhängig von der ¹²⁵JCYP-Konzentration, bei der vor Starten der Kinetik äquilibriert wurde (Tabelle 4).

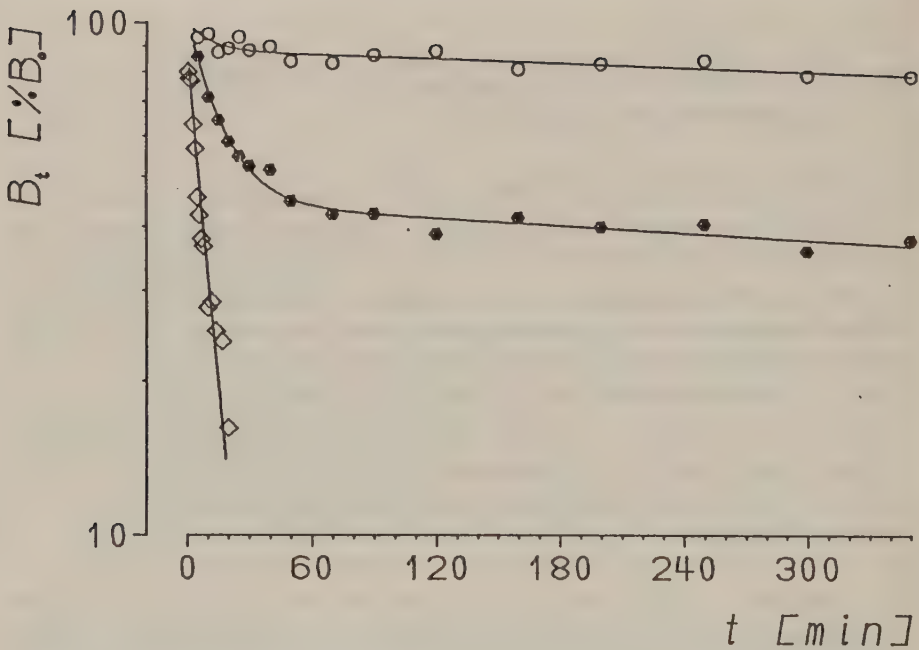


Abb.16. Dissoziationskinetiken von $^{125}\text{J CYP}$ an intakten Lymphozyten: Intakte Zellen (0.5×10^6 Zellen/500 μl) wurden bei verschiedenen $^{125}\text{J CYP}$ -Konzentrationen (o: 1.9 pmol/l; ●: 29.1 pmol/l; ◊: 197 pmol/l) äquibriert (120 Minuten, 37°C). Zur Messung der Dissoziationsreaktion wurde die Assoziationsreaktion durch Zugabe von 10^{-6}mol/l Timolol ausgeschaltet und damit die Kinetik gestartet. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion durch rasche Filtration gestoppt und die noch zellgebundene Radioaktivität gemessen. Die nach Subtraktion der unspezifischen Bindung verbleibende spezifische Bindung zur Zeit t (B_t) wurde halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (prozentuale Auftragung bezogen auf die spezifische Bindung zu Beginn der Dissoziation $B_0=100\%$). Tabelle 4 zeigt eine Zusammenstellung der Parameter der resultierenden biphasischen Kurvenverläufe. Die abgebildeten Bindungsdaten sind Mittelwerte aus drei solchen Experimenten.

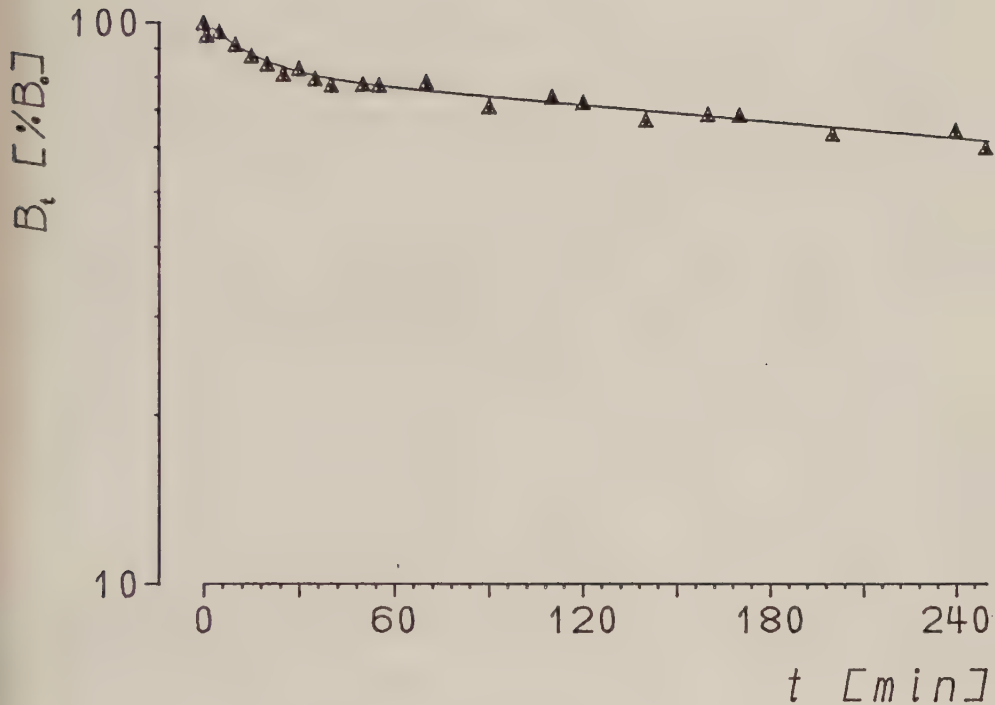


Abb.17. Dissoziationskinetik von $^{125}\text{J CYP}$ an Lymphozytenmembranen: Die Versuche wurden wie in Abb. 16 beschrieben durchgeführt und ausgewertet, wobei die Membranen (0.5×10^6 zerschlagene Zellen/500 μl) mit 4.1 pmol/l $^{125}\text{J CYP}$ äquilibriert wurden (120 Minuten, 37°C). Auch hier ergab sich ein biphasisches Dissoziationsverhalten des Radioliganden. Die Kinetik setzt sich zusammen aus einem steilen initialen Kurvenabschnitt, der der Dissoziation aus niederaffiner $^{125}\text{J CYP}$ -Bindung entspricht ($k_{-2}=0.063 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2}=11 \text{ min}$) und einem flachen zweiten Kurvenabschnitt (Dissoziation aus hochaffiner Bindung; $k_{-1}=0.001 \text{ min}^{-1}$; $t_{1/2}=690 \text{ min}$). Die abgebildeten Daten sind Mittelwerte aus drei solchen Experimenten.

An Membranen (Abb.17) betrug die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der schnell dissoziierenden Komponente (k_{-2}) 0.063 min^{-1} (entspricht einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 11 Minuten), die der langsam dissoziierenden Komponente (k_{-1}) 0.001 min^{-1} ($t_{1/2}=690 \text{ min}$, Tabelle 2). k_{-2} von intakten Lymphozyten war identisch mit der k_{-2} von Membranen ($p>0.05$ im t-Test, siehe B.9.), während die Dissoziation von der hochaffinen Bindungsstelle auf Membranen etwa doppelt so schnell wie die Dissoziation von der hochaffinen Bindungsstelle intakter Zellen erfolgte (k_{-1} von intakten Lymphozyten = 0.0005 min^{-1} , $t_{1/2}=1390 \text{ min}$, Tabelle 2).

Tab. 4. Abhängigkeit der Bindungsparameter aus Dissoziationskinetiken von der $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentrationen, bei der vor Starten der Kinetik äquilibriert wurde. Die nach Gleichung 21 ($n=2$) angepaßten Parameter sind zusammen mit ihrer Standardabweichung angegeben.

F (pmol/l)	B ₁ (%B)	B ₀₁ (%)	k ₋₂ ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$)	k ₋₁ ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$)
1.9	86.4	88.4 $\pm$ 1.7	91 $\pm$ 42	0.35 $\pm$ 0.10
29.1	53.7	44.3 $\pm$ 1.4	65 $\pm$ 4	0.55 $\pm$ 0.16
197.0	5.1	< 10	98 $\pm$ 7	nicht gemessen
			alle p- Werte>0.05	alle p- Werte>0.05

- F = $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration, bei der vor Starten der Dissoziationskinetik äquilibriert wurde
- B₀₁ = Anteil hochaffiner Bindung zu Beginn der Dissoziationskinetik
- B₀₂ = 100%-B₀₁=Anteil niederaffiner Bindung zu Beginn der Dissoziation (100%=spezifische $^{125}\text{JCYP}$ -Bindung im Äquilibrium)
- B₁ = Anteil hochaffiner Bindung im Sättigungsexperiment (Abb.10) berechnet nach Gleichung 21
- k₋₁ = Geschwindigkeitskonstante der langsam dissoziierenden hochaffinen Bindung des Radioliganden
- k₋₂ = Geschwindigkeitskonstante der schnell dissoziierenden niederaffinen Bindung des Radioliganden

4. Assoziationskinetik für $(-)^{125}\text{Jodocyanopindolol}$ an menschlichen Lymphozyten

Die zeitabhängig zunehmende $^{125}\text{JCYP}$ -Bindung wurde, wie in Abschnitt B.6.2.2. beschrieben, an intakten Lymphozyten gemessen (Abbildung 18) und anhand der unter B.6.2.1.b angegebenen Methode ausgewertet (Gleichung 25). Die beste Kurvenanpassung (niedrigster AIC-Wert; s.a. B.7.) an die dabei erhaltenen Bindungsdaten wurde erzielt unter der Annahme einer einheitlichen Assoziationsgeschwindigkeit bei der Bindung von $^{125}\text{JCYP}$ an alle spezifischen Bindungsstellen auf Lymphozyten. Die nach Gleichung 25 berechnete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} betrug 0.17 min^{-1} . Nach Gleichung 26 ließ sich dann die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante berechnen ($k_{+1}=1.8 \times 10^8 \text{ min}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

Gemäß Gleichung 1 (siehe auch B.5.1.1.1.)

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}}$$

konnten nun aus den kinetischen Bindungsdaten die Dissoziationskonstanten $K_{D1,2}$ berechnet werden (k_{-1} -, k_{-2} -Werte: siehe Tabelle X):

$$K_{D1} = \frac{0.5 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \times \text{mol/l}}{1.8 \times 10^8 \text{ min}^{-1}} = 2.7 \text{ pmol/l}$$

$$K_{D2} = \frac{84 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1} \times \text{mol/l}}{1.8 \times 10^8 \text{ min}^{-1}} = 460 \text{ pmol/l}$$

Die kinetisch bestimmten Werte der Dissoziationskonstanten stimmen dabei gut mit den unter Äquilibriumbedingungen erhaltenen Werten ($K_{D1}=2.1 \text{ pmol/l}$; $K_{D2}=440 \text{ pmol/l}$; siehe Tabelle 2) überein.

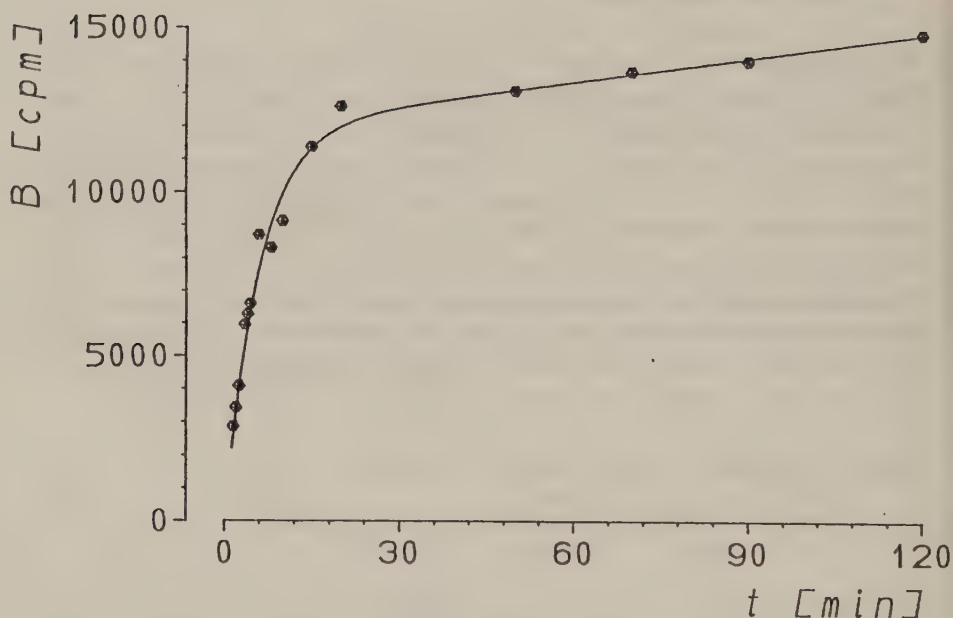


Abb. 18. Assoziationskinetik von $^{125}\text{JCYP}$: Die Kinetik wurde an intakten Lymphozyten (10^6 Zellen/ml) mit einer $^{125}\text{JCYP}$ Konzentration von 7.6 pmol/l in Einzelproben zu 0.5 ml bei einer Inkubationstemperatur von 37°C durchgeführt. Die spezifische Bindung bei dieser $^{125}\text{JCYP}$ Konzentration wurde wie unter B.5.2. beschrieben bestimmt. Die Assoziationsreaktion wurde durch Zugabe von 100 l-Aliquoten der Zellsuspension (siehe B.3.) gestartet. Nach definierten Zeitabständen (zwischen 0 und 120 Minuten) wurde die Reaktion durch rasche Filtration gestoppt (Trennung des gebundenen vom freien Liganden, siehe auch B.5.1.4.). Die Filter wurden anschließend, wie unter B.5.2. beschrieben, gewaschen und im Gammacounter gemessen. Durch Anpassung der zeitabhängig zunehmenden Menge an spezifisch gebundenem $^{125}\text{JCYP}$ an die Assoziationsfunktion (Gleichung 25; B.6.2.1., Methode b) konnte die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} und anhand Gleichung 26 die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante berechnet werden.

5. Verfahren zur isolierten Bestimmung der hochaffinen

Bindungsstelle

Die von uns durchgeführten Sättigungsexperimente über einen weiten $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentrationsbereich (siehe Abschnitt A.1.) stellen aufgrund der hohen Anzahl an Meßpunkten, des großen Verbrauchs des radioaktiv markierten Liganden, sowie der hohen Strahlenbelastung der Untersucher ein relativ aufwendiges Verfahren dar. Wir suchten daher nach einem mathematischen Modell zur isolierten Charakterisierung der hochaffinen Bindungsstelle in weniger aufwendigen Versuchen.

In den bislang durchgeführten Sättigungsexperimenten mit $^{125}\text{JCYP}$ an menschlichen Lymphozyten (1,2,12,13,15,16,17,35,37,42,43,45,46,47,61,63; s.a. A.8.) wurde ein relativ begrenzter Konzentrationsbereich des Radioliganden (etwa 10-150 pmol/l), der wie aus unseren Ergebnissen hervorgeht, vor allem Bindung an die hochaffine Bindungsstelle erfaßte.

Die genannten Arbeitsgruppen gingen dabei von einem Modell einer einheitlichen Klasse voneinander unabhängiger Bindungsstellen aus und paßten ihre Bindungsdaten nach einem 1-Rezeptormodell an (n=1 in Gleichung 11; 2-Parametermodell; lineare Regression des Scatchard-Plots).

Wir überprüften diese Verfahren auch anhand unserer Bindungsdaten. Dabei ergaben sich in Abhängigkeit des gewählten Konzentrationsbereichs des Radioliganden Fehler von mindestens 19% in der Abschätzung der Bindungsparameter der für $^{125}\text{JCYP}$ hochaffinen Bindungsstelle (Abbildung 19).

Aufgrund des großen Unterschieds der Affinität der beiden Bindungsstellen überprüften wir ein weiteres Anpassungsverfahren, das von der vereinfachenden Annahmen einer hochaffinen und einer nicht sättigbaren niederaffinen Bindungsstelle (Gleichung 27; 3-Parametermodell) hinsichtlich seiner Tauglichkeit zur Bestimmung der Bindungsparameter der hochaffinen Bindungsstelle.

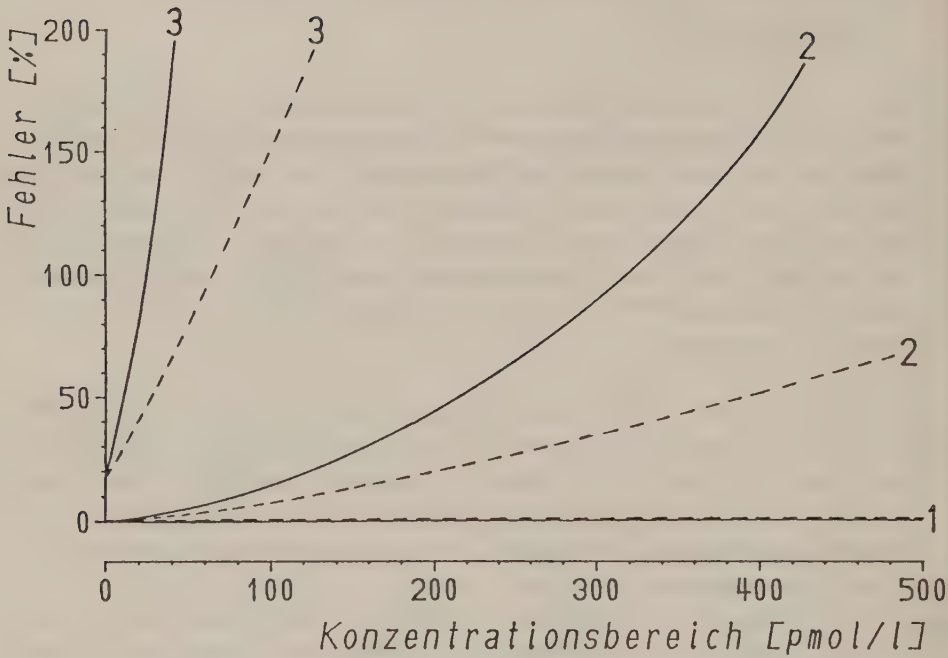


Abb.19. Vergleich verschiedener Anpassungsverfahren zur Ermittlung der Bindungsparameter der für $^{125}\text{JCYP}$ hochaffinen Bindungsstelle in Abhängigkeit des im Sättigungsexperiment verwendeten $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentrationsbereichs: Kurve (1) repräsentiert den Wert der Bindungsparameter K_D (—) und $B_{\max}$ (---) der hochaffinen Bindungsstelle im Modell zweier voneinander unabhängiger Klassen von Bindungsstellen ($n=2$ in Gleichung 11; 4-Parametermodell). Er läßt sich nur durch Anpassung von Bindungsdaten aus Sättigungsexperimenten über einen weiten Konzentrationsbereich des Radioliganden (1-600 pmol/l) mittels Gleichung 11 ($n=2$) genau ermitteln. Kurve (2) gibt den Fehler (prozentuale Abweichung vom Wert im 4-Parametermodell) bei der Anpassung an das vereinfachte Modell einer hochaffinen und einer nicht-sättigbaren niederaffinen Bindungsstelle (3-Parametermodell, Gleichung 12) in Abhängigkeit vom $^{125}\text{JCYP}$ -Meßbereich an. Kurve (3) zeigt den Fehler bei der Anpassung an ein Modell einer einheitlichen Rezeptorpopulation ($n=1$ in Gleichung 11) an.

$$B = \frac{B_{\max} \times F}{K_D + F} + C \times F \quad (27)$$

- B = Konzentration des spezifisch gebundenen Liganden
F = Konzentration des ungebundenen Liganden
B_{max} = Anzahl hochaffiner Bindungsstellen pro Zelle
K_D = Gleichgewichtsdissoziationskonstante der hochaffinen Bindungsstelle
C = die der nichtsättigbaren Bindungsstelle zugehörige Konstante

Dabei stellte sich heraus, daß der Fehler in der Abschätzung der Parameter der hochaffinen Bindungsstelle, der durch dieses vereinfachende Verfahren gemacht wird, dann toleriert werden kann (<10% prozentuale Abweichung vom Wert im 4-Parametermodell), wenn die Sättigungsexperimente in einem Konzentrationsbereich von etwa 1 - 80 pmol/l ¹²⁵JCYP durchgeführt werden (Abb.17).

Damit steht also ein Verfahren zur Verfügung, mit dem in weniger aufwendigen Versuchen (eingeschränkter Konzentrationsbereich des Radioliganden) die Bindungsparameter der für ¹²⁵JCYP hochaffinen Bindungsstelle mit großer Genauigkeit bestimmt werden können.

D. DISKUSSION

1. Zur Problematik der Interpretation der Ergebnisse aus Rezeptorbindungsstudien

Eine Vielzahl von Rezeptorbindungsstudien wurde bisher am β_2 -Adrenozeptor-Modell des menschlichen Lymphozyten mit dem Radioliganden $^{125}\text{JCYP}$ durchgeführt. Dabei wurde der Einfluß physiologischer Zustände, menschlicher Erkrankungen und von Pharmaka auf die Bindung des Radioliganden untersucht (1,2,12,13,15,16,17,35,37,42,43,45,46,47,61,63). Diese Bindungsstudien ergaben jedoch schon bei Normalpopulationen eine starke Streuung von Rezeptordichte (zwischen 700 und 13000 spezifische Bindungsstellen pro Lymphozyt (45)) und Affinität des Radioliganden zum Rezeptor. Interessanterweise gehen hohe Rezeptordichten (B_{max}) meist mit niedrigen Affinitäten (entspricht hohen K_D -Werten; siehe B.5.1.) einher. Die Ergebnisse der klinischen Studien sind zum Teil widersprüchlich (43,61).

Die Rezeptorcharakterisierung in diesen Arbeiten erfolgte fast ausschließlich aufgrund von Sättigungsexperimenten mit Radioligandkonzentrationen zwischen etwa 10 und 150 pmol/l (innerhalb dieser Grenzen wurden teilweise höhere und teilweise niedrigere Konzentrationsbereiche gewählt). In der Auftragung nach Scatchard (siehe B.5.1.1.2.) ergab sich dabei eine mehr oder weniger lineare Punkteverteilung, weshalb man das Modell einer einheitlichen Bindungsstellenpopulation (1-Rezeptormodell) der Versuchsauswertung zugrunde legte.

Wir dagegen führten Sättigungsexperimente über einen erheblich weiteren Konzentrationsbereich (1.5-600 pmol $^{125}\text{JCYP}$) durch und erhielten nun gebogene, nach oben konkave Kurvenverläufe in der Auftragung nach Scatchard (Abb. 11, Abb. 13). Die oben genannten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen können angesichts unserer Ergebnisse nun folgendermaßen interpretiert werden: Aufgrund der eher niedrigen $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentrationen (10-150 pmol/l) wurde hauptsächlich hochaffine Bindung des Radioliganden gemessen. We-

gen des beschränkten Konzentrationsbereichs ergab sich in der Auftragung nach Scatchard aber eine nur scheinbar lineare Punkteverteilung, während in Wirklichkeit nur ein mehr oder weniger großer Ausschnitt eines eigentlich gebogenen Scatchard-Plots vorlag. Dies würde auch die starke Streuung und die oben erwähnte Korrelation zwischen den Bindungsparametern K_D und B_{max} erklären: Sättigungsexperimente in einem niedrigen Konzentrationsbereich (innerhalb der erwähnten Grenzen) erfaßten fast ausschließlich den ersten steilen Anteil des in Wirklichkeit gebogenen Scatchard-Plots und es ergaben sich niedrige B_{max} - und K_D -Werte. Die in einem höheren Konzentrationsbereich durchgeführten Experimente erfaßten dagegen in zunehmendem Maße auch den flachen zweiten Anteil der eigentlich gebogenen Kurve, was zu höheren K_D - und B_{max} -Werten führte.

Unsere Ergebnisse zeigen deshalb wie wichtig für die Interpretation von Sättigungsexperimenten die Auswahl eines ausreichend großen Konzentrationsbereichs des Radioliganden ist. Das von den erwähnten Arbeitsgruppen zugrundegelegte 1-Rezeptormodell ist aufgrund unserer Ergebnisse in jedem Fall unzulässig (siehe auch Abb. 19).

Sager et al. (79) beobachteten in Sättigungsexperimenten über einen erweiterten Konzentrationsbereich mit 3H -DHA ebenfalls nicht-lineare Scatchard-Plots an intakten menschlichen Lymphozyten. Sie schlossen daraus auf zwei Klassen voneinander unabhängiger Bindungsstellen für diesen Liganden. Nicht-lineare Scatchard-Plots aus Sättigungsexperimenten über erweiterte Konzentrationsbereiche mit dem Radioliganden $^{125}JCYP$ an intakten Lymphozyten wurden außer von uns kürzlich auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (67,80). Brodde et al. (11) interpretierten dies als Zusammensetzung aus hochaffiner Rezeptorbindung und einer nicht-sättigbaren (niederaffinen) Fixierung des Liganden an intrazelluläre Strukturen (transmembranaler Transport (56)). Dieses Phänomen bezeichnet Brodde als ein Problem von Bindungsstudien mit lipophilen Radioliganden (wie $^{125}JCYP$ oder 3H -DHA) an intakten Zellen. Für hydrophile Liganden wie 3H -CGP 12177 sollten nach Brodde

solche transmembranalen Transportvorgänge keine Rolle spielen. Nicht-lineare Scatchard-Plots wurden von De Meyts et al. (28) im Rahmen von Bindungsstudien an Insulin-Rezeptoren auf eine negative Kooperativität der Rezeptoren zurückgeführt.

Es zeigt sich also, daß anhand von Sättigungsexperimenten allein noch keine endgültige Aussage über ein Modell, das die Bindung eines Liganden an Rezeptoren tragendes Material zutreffend beschreibt, möglich ist. Diese Versuchsart charakterisiert nämlich lediglich die Bindung des Liganden unter den Bedingungen eines Gleichgewichts zwischen Ausbildung (Assoziationsreaktion) und Wiederauflösung (Dissoziationsreaktion) des Rezeptor-Ligandkomplexes (siehe auch B.5.). Ein nach oben konkaver Scatchard-Plot kann Ausdruck mehrerer unabhängiger Klassen von Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten zum Liganden sein. Er kann aber auch beruhen auf einem uneinheitlichen Liganden (z.B. razemisches Gemisch aus (+)- und (-)-Enantiomer) mit unterschiedlichen Affinitäten der verschiedenen Ligand-Subtypen gegenüber einer einheitlichen Rezeptorpopulation. Zudem können kooperative Effekte oder transmembranale Transportmechanismen ("trapping" des Liganden) für die Nichtlinearität verantwortlich sein.

Auch aus kinetischen Experimenten wurden Modellvorstellungen zur Wechselwirkung zwischen Liganden und Rezeptoren tragendem Material abgeleitet. Dissoziationskinetiken, die einer einfachen Exponentialfunktion gehorchen, wurden als Beleg einer einheitlichen Rezeptorpopulation angeführt. Davon abweichende, biphasische Kinetiken, mit einer schnell und einer langsam dissoziierenden Komponente wurden von Bürgisser et al. (20) für hochaffine razemische Liganden ($^{125}\text{JHYP}$, ^3H -Carazolol) auf eine Überlagerung der unterschiedlichen Dissoziationsgeschwindigkeiten der (+)- und (-)-Enantiomere zurückgeführt. Dagegen erhielten Hoyer et al. (38) biphasische Dissoziationskinetiken sowohl für das Razemat von $^{125}\text{JCYP}$ als auch für die reinen (+)- und (-)-Enantiomere. Sie interpretierten ihre Ergebnisse durch ein Isomerisationsmodell

nach Ross (77). Dabei wird die Existenz zweier ineinander überführbarer Rezeptorzustände diskutiert.

Dissoziationskinetiken wurden in den genannten Arbeiten nach Äquilibrierung mit jeweils nur einer einzigen Konzentration des Radioliganden durchgeführt. Das heißt der Start der Kinetik erfolgte ausgehend von einem einzigen Besetzungszustand der Bindungsstellen durch den Liganden. Wie aus unseren Versuchsergebnissen hervorgeht (Abb.16), kann jedoch der Verlauf einer solchen Kinetik stark von der zur Äquilibrierung verwendeten Ligand-Konzentration abhängen.

Die für die Rezeptor-Ligand Wechselwirkung zutreffende Modellvorstellung kann, wie im Folgenden gezeigt werden soll, nur aus dem Vergleich der Ergebnisse aus Gleichgewichtsversuchen (Sättigungs-, Verdrängungsexperimente) und eingehenden kinetischen Untersuchungen (Assoziations- und Dissoziationskinetiken nach Äquilibrierung mit verschiedenen Ligand-Konzentrationen) abgeleitet werden.

2. Interpretation unserer Ergebnisse durch ein Modell zweier voneinander unabhängiger Bindungsstellen für $^{125}\text{Jodocyanopindolol}$

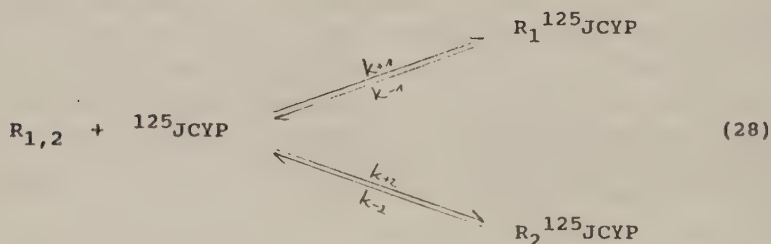
Sättigungsexperimente mit (-)- $^{125}\text{Jodocyanopindolol}$ ($^{125}\text{JCYP}$) über einen weiten Konzentrationsbereich (1.5 - 600 pmol/l) ergaben an intakten Lymphozyten sowie an Lymphozytenmembranen gebogene, nach oben konkave Kurvenverläufe in der Auftragung nach Scatchard (Abb.11. und Abb.13.)

Hemmungsexperimente ergaben eine zweistufige Verdrängung der Bindung von $^{125}\text{JCYP}$ durch den unmarkierten Liganden Timolol (Abbildung 14).

Die Dissoziation von $^{125}\text{JCYP}$ von intakten Zellen sowie von Membranen war biphasisch. Sie setzte sich zusammen aus der schnellen Dissoziation aus einem niederaffinen Bindungszustand des Radioliganden und der langsamen Dissoziation aus einem hochaffinen $^{125}\text{JCYP}$ -Bindungszustand (Abb.16 und Abb.17). In Kinetiken, die

nach Äquilibrierung mit verschiedenen $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentrationen durchgeführt wurden, waren die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten sowohl der schnell als auch der langsam dissoziierenden Komponente (k_{-2} und k_{-1}) unabhängig von der eingesetzten $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration, während sich ihr Anteil entsprechend der unterschiedlichen Besetzung in Abhängigkeit von der eingesetzten $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration änderte (Tabelle 4).

Die plausibelste Interpretation dieser Ergebnisse ist durch ein Modell zweier voneinander unabhängiger Populationen von Bindungsstellen R_1 und R_2 mit unterschiedlicher Affinität gegenüber $^{125}\text{JCYP}$ möglich:



Die unter Zugrundelegung dieses Modells berechneten Bindungsparameter waren in allen Versuchen für beide Bindungsstellen signifikant (z-Test: $p < 0.05$).

Die in den Verdrängungsexperimenten anhand der Stufenhöhe berechnete anteilmäßige Besetzung beider Klassen von Bindungsstellen (B_{01} und B_{02}) änderte sich in Abhängigkeit von der eingesetzten $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration. Sie war in guter Übereinstimmung mit der aus den Sättigungsexperimenten berechneten prozentualen Besetzung beider Bindungsstellenklassen bei derselben $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration (Tabelle 3).

Auch in den Dissoziationskinetiken war die prozentuale Besetzung hoch- und niederaffiner Bindungsstellen zu Beginn der Dissoziation, also nach Äquilibrierung bei einer bestimmten $^{125}\text{JCYP}$ Konzentration, in guter Übereinstimmung mit dem aus den Sättigungs-

experimenten abgeschätzten anteilmäßigen Besetzungszustand bei derselben $^{125}\text{JCYP}$ Konzentration (Tabelle 4).

Zudem stimmten die kinetisch bestimmten Werte der Dissoziationskonstanten der hoch- und niederaffinen Bindungsstellenklasse (K_{D1} und K_{D2}) gut mit den unter Äquilibriumbedingungen erhaltenen Werten überein (siehe C.3.).

Dabei erfolgte die Assoziation von $^{125}\text{JCYP}$ mit einer einheitlichen Geschwindigkeit an alle spezifischen Bindungsstellen auf Lymphozyten (siehe C.3.). Ein solches Assoziationsverhalten wurde von Hoyer und anderen (38) als Bedingung für ein Modell zweier voneinander unabhängiger Bindungsstellen vorausgesetzt.

3. Diskussion anderer Modelle

Bezüglich der Interpretation von Bindungsdaten aus Radioligand-Bindungsstudien hinsichtlich heterogener Bindungsstellenpopulationen existiert neben der soeben besprochenen eine Reihe weiterer Modellvorstellungen, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

3.1. Das Isomerisationsmodell

Hinsichtlich unserer Versuchsergebnisse muß dabei in erster Linie ein Isomerisationsmodell, das Hoyer und andere (38) für die Bindung von $^{125}\text{JCYP}$ an β -Adrenozeptoren des linken Ventrikels am Meerschweinchenherzen postulierten, in Betracht gezogen werden. Diese von Ross und anderen (77) erstmals beschriebene Modellvorstellung erklärt das biphasische Dissoziationsverhalten eines Radioliganden mit der Existenz zweier ineinander überführbarer Rezeptorzustände. Die Bindung des Radioliganden L an einen niederaffinen Rezeptorzustand R_1 (schnell dissoziierende Komponente der Dissoziationskinetik) führt zu einer durch die Radioligandbindung

induzierten Rezeptorisomerisierung, wobei ein hochaffiner Rezeptorzustand R_h (langsam dissoziierende Komponente der Kinetik) entsteht:



Nach diesem Modell ist das Verhältnis R_1L/R_hL konstant. Es ist nur abhängig von der Isomerisationskonstante I , aber unabhängig von der Besetzung des Rezeptors durch den Liganden. Folglich zeigen Dissoziationskinetiken, die diesem Modell entsprechen, immer den selben Kurvenverlauf und die selben Bindungsparameter, unabhängig von der eingesetzten Radioligandkonzentration (k_{-1} , k_{-2} , B_{01} , B_{02} konstant).

In unseren Experimenten waren zwar k_{-1} und k_{-2} konstant, dagegen änderte sich aber der Anteil schnell und langsam dissoziierender Bindungsstellen (B_{01} und B_{02}), in Abhängigkeit von der eingesetzten $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration (Abb.16 und Tab.4).

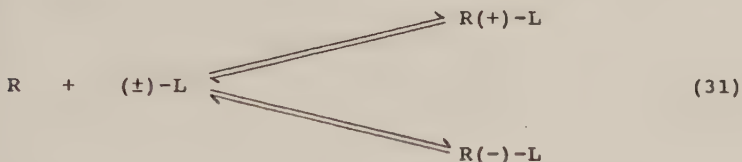
Ein weiteres Argument gegen die Annahme des Isomerisationsmodells für unsere Ergebnisse geht aus einer Arbeit von Vauquelin und anderen (84) hervor. Sie ermittelten für das Isomerisationsmodell folgende Beziehung für die in Sättigungsexperimenten meßbare Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D :

$$K_D = \frac{K \times I}{I + 1} \quad (30)$$

Nach diesem Term ist K_D eine aus den beiden Konstanten K und I ableitbare Größe und daher selbst eine Konstante. Wenn das Isomerisationsmodell gilt, ergeben sich deshalb in der Auftragung der Sättigungsexperimente nach Scatchard (siehe B.5.1.1.1.) lineare Kurvenverläufe. Unsere Scatchard-Plots waren dagegen eindeutig nicht-linear (Abb.11 und Abb.13).

3.2. Modell eines razemischen Liganden

Bürgisser und andere (19) führten die biphasischen Bindungskinetiken der β -adrenergen Radioliganden ^{125}J odohydroxypindolol ($^{125}\text{JHYP}$) und ^3H -Carazolol auf die Verwendung eines Razemats, also einem Gemisch aus dem (+)- und dem (-)-Enantiomer des jeweiligen Radioliganden, zurück. Dabei erklärten sie das komplexe Bindungsverhalten mit einer unterschiedlichen Affinität der beiden Enantiomere gegenüber einer einheitlichen Rezeptorpopulation:



Hoyer und andere (38) erhielten dagegen mit ^{125}J CYP an Membranpräparationen des Meerschweinchenherzens nicht nur für das razemische Gemisch, sondern auch für die reinen (+)- und (-)-Enantiomere des Radioliganden biphasische Dissoziationskinetiken. Auch wir erhielten mit dem reinen (-)-Enantiomer von ^{125}J CYP biphasische Kinetiken. Diese Ergebnisse sind also nicht mit dem eben vorgestellten Modell vereinbar.

3.3. Kooperativität

Als weiteren Aspekt bei der Interpretation unserer Ergebnisse zogen wir die Möglichkeit kooperativer Effekte der Bindungsstellen in einem 1-Rezeptormodell in Betracht. Kooperativität bedeutet in diesem Zusammenhang eine Abhängigkeit der Affinität der Bindungsstellen vom Grad ihrer Besetzung durch Liganden. Unsere gebogenen, nach unten konkaven Scatchard-Plots könnten demnach als eine mit zunehmender Besetzung spezifischer Bindungsstellen kontinuierlich abnehmende Affinität von ^{125}J CYP gegenüber dem Rezeptor verstanden werden (entspricht einer mit steigender spezifischer

Bindung zunehmenden Abflachung des Scatchard-Plots). Dies würde einer negativen Kooperativität der Bindungsstellen entsprechen.

Gegen diese Möglichkeit sprechen jedoch unsere Dissoziationskinetiken. Wir starteten sie durch Zugabe des unmarkierten Liganden Timolol im Überschuß, so daß alle freien bzw. freiwerdenden Bindungsstellen durch diesen besetzt wurden (damit wurde die erneute Assoziation des aus seiner Bindung abdissoziierenden Radioliganden verhindert, s.a. B.6.1.). Während der Messung der Dissoziationsreaktion waren immer alle Bindungsstellen durch $^{125}\text{JCYP}$ oder Timolol besetzt. Da sich also der Besetzungszustand der Bindungsstellen im Verlaufe der Dissoziationskinetik nicht veränderte, konnte das Dissoziationsverhalten des Radioliganden nicht durch kooperative Effekte beeinflusst werden. Das in Abhängigkeit von der eingesetzten $^{125}\text{JCYP}$ -Konzentration erhaltenen unterschiedliche Dissoziationsverhalten des Radioliganden (Abb.14) kann deshalb nicht durch kooperative Effekte erklärt werden.

Des weiteren sprechen die von uns erhaltenen zweistufigen Verdrängungskurven (Abb.14) gegen die Möglichkeit kooperativer Effekte in unserem System. Kooperativität von Bindungsstellen führt nämlich in solchen Experimenten zu gleichmäßigen Veränderungen der Steilheit der Kurvenverläufe, nicht aber zu einer Stufenbildung, wie wir sie beobachteten.

3.4. Transportmechanismen

Lyslo und Henneberg (56) konnten an kultivierten Säugetierzellen ein aktives Transportsystem für Amine nachweisen. Dieses System war unter anderem auch in der Lage $^{125}\text{JCYP}$ in die Zellen aufzunehmen. Daher fragten wir uns, ob nicht zwei unterschiedliche zugleich ablaufende Prozesse, nämlich einerseits die Bindung des Radioliganden an Rezeptoren der Zelloberfläche und andererseits sein aktiver Transport in das Zellinnere für das komplexe Bindungsverhalten von $^{125}\text{JCYP}$ verantwortlich sein könnten. Biphasisches Dissoziationsverhalten könnte dann aufgefaßt werden als die

Summe einer raschen Abdissoziation des Radioliganden von Bindungsstellen an der Zelloberfläche und der relativ langsam ablaufenden Diffusion des ins Zellinnere transportierten Radioliganden nach außen.

Zwei Argumente stehen der Interpretation unserer Ergebnisse nach dieser Theorie jedoch entgegen:

Zum einen fanden wir biphasisches Dissoziationsverhalten nicht nur bei intakten Zellen sondern auch an Membranpräparationen. Zum anderen gilt die gerade besprochene Erklärung biphasischer Dissoziationskinetiken mit einem Transportmechanismus nur bei Anfertigung der Kinetiken nach der Verdünnungsmethode (Verhinderung der Assoziationsreaktion durch starke Verdünnung der Inkubationsansätze; siehe B.6.1.1.). Bei der von uns gewählten Methode (Verhinderung der Assoziationsreaktion durch Zugabe eines unmarkierten Liganden im Überschuß, der alle freien bzw. freiwerdenden Bindungsstellen besetzt) bleibt dagegen die Konzentration des Radioliganden in den Inkubationsansätzen während der Kinetiken konstant. Es kann also im Gegensatz zu ersterer Methode kein Konzentrationsgradient zwischen Zellinnerem und der Umgebung entstehen, der eine Diffusion des Radioliganden nach außen erlauben würde.

4. Schlußfolgerungen

Kinetische Bindungsstudien in Verbindung mit Bindungsexperimenten unter Gleichgewichtsbedingungen sind ein hervorragendes Instrumentarium bei der Analyse komplexer Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Liganden. Sie eignen sich zum Nachweis der für heterogene Bindungsstellenpopulationen jeweils gültigen Modellvorstellungen. Wie unsere Ergebnisse zeigen, ist dabei besonders wichtig:

1. Die Durchführung von Sättigungsexperimente über einen möglichst großen Konzentrationsbereich des Radioliganden (19)

2. Die Durchführung von Dissoziationskinetiken nach Äquilibrierung mit verschiedenen Radioligandkonzentrationen
3. Der Vergleich der Bindungseigenschaften des Radioliganden am intakten Zellsystem und an Zellmembranen (zerschlagene Zellen)

Nach unseren Ergebnissen tragen menschliche Lymphozyten zwei voneinander unabhängige Klassen von Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten gegenüber dem Radioliganden $^{125}\text{JCYP}$. Damit gelang erstmals die eindeutige Aufklärung des für die Bindung des Radioliganden $^{125}\text{JCYP}$ an dieses Gewebe gültigen Modellvorstellung.

Bisher angefertigte Bindungsstudien gingen dagegen von einer einheitlichen β -Adrenozeptorpopulation auf menschlichen Lymphozyten aus, die aufgrund von Verdrängungsexperimenten mit verschiedenen β_1 - und β_2 -spezifischen Liganden der β_2 -Subklasse zugeordnet wurde (13,32). Die dabei gemessenen, von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe stark wechselnden Angaben über Rezeptordichte ($B_{\max}$ zwischen 700 und 13000 Bindungsstellen pro Lymphozyt) und -affinität (K_D zwischen 10 und 60 pmol/l) (45) liegen zwischen den von uns erhaltenen Werten der hoch- und niederaffinen Bindungsstelle. Dies beruht unserer Meinung nach auf der linearen Anpassung von nur scheinbar geraden Scatchard-Plots aus Sättigungsexperimenten über beschränkte Konzentrationsbereiche des Radioliganden, die in Wirklichkeit nur einen mehr oder weniger großen Ausschnitt einer eigentlichen gebogenen Kurve darstellten (siehe auch D.1.).

Wir untersuchten auch die Abhängigkeit der Ergebnisse aus Anpassungsverfahren nach verschiedenen mathematischen Modellen vom eingesetzten Konzentrationsbereichs des Radioliganden (Abbildung 19). Die Anpassung der Bindungsdaten nach dem 1-Rezeptormodell ist danach in jedem Konzentrationsbereich mit großen Fehlern behaftet und daher unzulässig. Die Berücksichtigung der Rezeptorheterogenität ist daher zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse in jedem Fall notwendig.

Es konnte allerdings ein vereinfachendes Modell (3-Parametermo-

dell, siehe C.5.) zur isolierten Charakterisierung der hochaffinen Bindungsstelle in weniger aufwendigen Versuchen (eingeschränkter Konzentrationsbereich des Radioliganden) vorgestellt werden.

Aufgrund der geschilderten Zusammenhänge soll darauf hingewiesen werden, daß auch in anderen Radioligand-Rezeptor-Systemen, die in Studien mit klinischer Fragestellung zunehmend an Bedeutung gewinnen, eine genaue Untersuchung der Bindungseigenschaften des Radioliganden vorangehen sollte, da nur so ein tragfähiges Modell zur korrekten Auswertung der Versuchsdaten erstellt werden kann.

Die durch uns nachgewiesene Heterogenität der Bindungsstellen auf Lymphozyten wirft nun eine Reihe neuer Fragestellungen auf:

1. Gibt es auf menschlichen Lymphozyten neben den β -Adrenozeptoren noch eine zweite durch $^{125}\text{JCYP}$ markierbare Rezeptorpopulation?

Es konnte z.B. gezeigt werden, daß $^{125}\text{JCYP}$ nicht nur β -Adrenozeptoren markiert, sondern auch Affinität (K_D -Werte von etwa 200 pmol/l an Rattengehirn-Membranen) zu einer bestimmten Klasse von Serotonin-Rezeptoren (5HT-1_B Rezeptoren) besitzt (39). Da die von uns gemessenen K_D -Werte der niederaffinen Bindungsstelle auf Lymphozyten in derselben Größenordnung liegen, könnte es sich dabei um solche Rezeptoren handeln.

2. Handelt es sich um Subtypen oder verschiedene Zustände von β_2 -Adrenozeptoren?

Hoch- und niederaffine Bindung an β -Adrenozeptoren ist für Agonisten im Gegensatz zu Antagonisten (wie z.B. $^{125}\text{JCYP}$) seit längerer Zeit bekannt (9,26,27,82). Die für Agonisten hochaffine Bindung stellt einen an das GTP-bindende Regulatorprotein (G_S) gekoppelten Rezeptorzustand dar (9,23,27), der, wie man bisher annahm, erst durch Bindung des Agonisten entsteht (82). Niederaffine Agonistenbindung repräsentiert die Bindung an nicht G_S gekoppelte Rezeptoren (9). Nerme et al. (65) konnten

dagegen kürzlich nachweisen, daß etwa 15% der β -Adrenozeptoren spontan, also in Abwesenheit von Agonisten, in einer an das G_s -Protein gekoppelten Form vorliegen, was in guter Übereinstimmung mit dem von uns gemessenen Anteil hochaffiner Bindung des Antagonisten $^{125}\text{JCYP}$ wäre.

3. Welche biologische Bedeutung kommt jeder der beiden Bindungsstellenpopulation zu?

Es gibt Hinweise auf funktionell wichtige Disulfidbrücken im β -Adrenozeptor-Adenylatzyklase-System (44,68). Deshalb ergibt sich ein experimenteller Zugang in dieser Frage durch die Untersuchung des Einflusses der Disulfidbrückenspaltende Thiolverbindungen Dithiothreitol (DTT; (25,41)) auf beide Bindungsstellen (55,84,85). Jüngste Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe (54) zeigen, daß die für $^{125}\text{JCYP}$ hochaffinen Bindungsstellen durch die reduktive Spaltung von Disulfidbrücken unter dem Einfluß von DTT in niederaffine Bindungsstellen überführt werden können. Dieser Vorgang ging einher mit einer Stimulierung der Adenylatzyklase, ersichtlich an einem Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels.

Eine genaue Charakterisierung beider Bindungsstellen stellt sich damit als Thema weiterer experimenteller Arbeiten.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Sättigungsexperimente mit (-)- 125 Jodocyanopindolol (125 JCYP), einem Radioliganden, der mit hoher Spezifität an Betarezeptoren bindet, wurden über einen weiten Konzentrationsbereich (1.5 - 600 pmol/l) an intakten menschlichen Lymphozyten sowie an Lymphozytenmembranen durchgeführt. Sie ergaben nichtlineare, nach unten gebogene konkave Kurvenverläufe in der Auftragung nach Scatchard, die auf die Existenz zweier sättigbarer Bindungsstellen hinwiesen: Eine für 125 JCYP hochaffine Bindungsstelle (Bindungsstellendichte $B_{\max 1}=1000\pm 400$ Moleküle/Zelle, Gleichgewichtsdissoziationskonstante $K_{d1}=2.1\pm 0.9$ pmol/l in den Versuchen mit intakten Zellen; $B_{\max 1}=550\pm 190$ Molek/Zelle, $K_{d1}=4.1\pm 0.9$ pmol/l an Membranen) und eine für 125 JCYP niederaffine Bindungsstelle ($B_{\max 2}=9150\pm 3590$ Molek/Zelle, $K_{d2}=440\pm 50$ pmol/l an intakten Zellen; $B_{\max 2}=11560\pm 4690$ Molek/Zelle, $K_{d2}=410\pm 70$ pmol/l an Membranen). Hemmungsexperimente ergaben eine zweistufige Verdrängung der Bindung von 125 JCYP durch den unmarkierten Liganden Timolol. Die Dissoziation von 125 JCYP von intakten Zellen sowie von Membranen war biphasisch. Sie setzte sich zusammen aus der langsamen Dissoziation aus einem hochaffinen Bindungszustand des Radioliganden (Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante $k_{-1}=(0.5\pm 0.2)\times 10^{-3}$ min $^{-1}$ für intakte Lymphozyten und $k_{-1}=(1.0\pm 0.1)\times 10^{-3}$ min $^{-1}$ für Membranen) und der schnellen Dissoziation aus einem niederaffinen 125 JCYP-Bindungszustand ($k_{-2}=(80\pm 20)\times 10^{-3}$ min $^{-1}$ für intakte Lymphozyten und $k_{-2}=(60\pm 10)\times 10^{-3}$ min $^{-1}$ für Membranen). In Kinetiken, die nach Äquilibrierung mit verschiedenen 125 JCYP-Konzentrationen durchgeführt wurden, waren die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten sowohl der schnell als auch der langsam dissoziierenden Komponente (k_{-2} und k_{-1}) unabhängig von der eingesetzten 125 JCYP-Konzentration, während sich der Anteil schnell und langsam dissoziierender Bindungsstellen entsprechend ihrem unterschiedlichen Besetzung beim Starten der Kinetiken in Abhängigkeit von der eingesetzten 125 JCYP-Konzentration änderte. Die Assoziation von 125 JCYP erfolgte mit einer einheitlichen Geschwindigkeit an alle spezifischen Bindungsstellen auf Lymphozyten. Die kine-

tisch bestimmten Werte der Dissoziationskonstanten der hoch- und niederaffinen Bindungsstellenklasse (K_{D1} und K_{D2}) stimmten gut mit den unter Äquilibriumbedingungen erhaltenen Werten überein.

Die beste Interpretation dieser Ergebnisse ist durch ein Modell zweier voneinander unabhängiger Populationen von Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität gegenüber $^{125}\text{JCYP}$ möglich. Damit gelang uns erstmals die eindeutige Festlegung der in diesem System gültigen Modellvorstellung der Ligand-Rezeptorwechselwirkung. Bisher ebenfalls diskutierte alternative Modelle (Modell einer einheitlichen Klasse von Bindungsstellen, Modell eines racemischen Liganden, Isomerisationsmodell, Kooperativität, transmembranale Transportmechanismen) konnten ausgeschlossen werden.

Die durch uns nachgewiesene heterogene Bindungsstellen-Population ist wegen ihrer Bedeutung für die exakte Bestimmung der β -Adrenozeptoren in künftigen Rezeptorstudien in diesem und anderen Systemen zu beachten. Eine genaue Charakterisierung beider Bindungsstellen stellt sich als Thema weiterer Untersuchungen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. AARONS, R.D.; NIES, A.S.; GAL, J.; HEGESTRAND, L.R.; MOLINOFF, P.B.: Elevation of β -Adrenergic Receptor Density in Human Lymphocytes after Propranolol Administration. *J. Clin. Invest.* 65, 949-957 (1979)
2. AARONS, R.D.; NIES, A.S.; GERBER, J.G.; MOLINOFF, P.B.: Decreased Beta Adrenergic Receptor Density on Human Lymphocytes after Chronic Treatment with Agonists. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 224, 1-6 (1983)
3. ABRAMSON, S.N.; MCGONIGLE, P.; MOLINOFF, P.B.: Evaluation of Models for Analysis of Radioligand Binding Data. *Mol. Pharmacol.* 31, 103-111 (1987)
4. AHLQUIST, P.R.: A Study of the Adrenotropic Receptors. *Amer. J. Physiol.* 153, 586-600 (1948)
5. ARIENS, E.J.; SIMONIS, A.N.: Physiological and Pharmacological Aspects of Adrenergic Receptor Classification. *Biochem. Pharmacol.* 32, 1539-1545 (1983)
6. ATLAS, D.; STEER, M.L.; LEVITZKI, A.: Stereospecific Binding of Propranolol and Catecholamines to the Beta-Adrenergic Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 4246-4248 (1974)
7. BARNES, P.J.: Beta Adrenoceptors in Lung Tissue. in: *Beta Adrenoceptors in Asthma*. Acad. Press, London, 67-95 (1984)
8. BENNETT, J.P.: Methods in Binding Studies. in: *Neurotransmitter Receptor Binding*. Eds.: H.I. Yamamura, S.J. Enna, M.J. Kuhar New York, Raven Press (1978)
9. BIRNBAUMER, L.; MATTERA, R.; CODINA, J.; HILDEBRAND, J.D.; ROJAS, F.J.: Regulation of Receptors and Adenylyl Cyclase by N-Proteins. in: *Adrenergic Receptors: Molecular Properties and Therapeutic Implications*. Symposium St.-Paul-de-Vence, France, October 21-24, 1984, Schattauer Verlag, Symposia Medica Hoechst 19, 159-189 (1985)
10. BÓYUM, A.: Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood. *Scand. J. Clin. Invest.* 21 (Suppl. 97), 77-89 (1968)
11. BRODDE, O.E.; BECKERINGH, J.J.; MICHEL, M.C.: Human Heart β -Adrenoceptors: a Fair Comparison with Lymphocyte β -Adrenoceptors? *Tr. Pharm. Sci.* 8, 403-407 (1987)
12. BRODDE, O.E.; BRINKMANN, M.; SCHEMUTH, R.: Terbutaline-Induced Desensitisation of Human Lymphocyte β_2 -Adrenoceptors - Accelerated Restoration of β -Adrenoceptor Responsiveness by Prednisone and Ketotifen. *J. Clin. Invest.* 76, 1096-1101 (1985)

13. BRODDE, O.E.; DAUL, A.; O'HARA, N.: Properties of α - and β -Adrenoceptors in Circulating Blood Cells of Patients with Essential Hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7 (6), 162-167 (1985)
14. BRODDE, O.E.; ENGEL, G.; HOYER, D.; BOCK K.D.; WEBER, F.: The β_2 -Adrenergic Receptor in Human Lymphocytes: Subclassification by the Use of a New Radioligand, ($\pm$)¹²⁵Iodocyanopindolol. *Life Sci.* 11, 2189-2198 (1981)
15. BRODDE, O.E.; PRYWARRA, A.; ANLAUF, M.: Increased Number of β_2 -Adrenoceptors in Circulating Lymphocytes of Patients with Essential Hypertension. *J. Hypertension* 1 (2), 263-266 (1983)
16. BRODDE, O.E.; PRYWARRA, A.; DAUL, A.: Correlation Between Lymphocyte β_2 -Adrenoceptor Density and Mean Arterial Blood Pressure: Elevated β -Adrenoceptors in Essential Hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6, 678-682 (1984)
17. BRUSCHI, G.; ORLANDINI, G.; PAVARANI, C.; SPAGGIARI, M.; TACINELLI, L.; CAVATOFFA, A.: Lymphocytic Beta-Adrenoceptor Abnormality in Primary Hypertension. *IRCS Med. Sci.* 12, 461-462 (1984)
18. BUDDECKE, E.: *Grundriss der Biochemie* Walter de Gruyter Verlag, 1. Aufl., 7-9 (1970)
19. BÜRGISSER, E.: Radioligand-Receptor Binding Studies: What's wrong with the Scatchard Analysis? *Trends in Pharmacol. Sci.*, 142-144 (1984)
20. BÜRGISSER, E.; LEFKOWITZ, R.J.; DE LEAN, A.: Alternative Explanation for the Apparent "Two-Step" Binding Kinetics of High-Affinity Racemic Antagonist Radioligands. *Mol. Pharmacol.* 19, 509-512 (1980)
21. CARLSSON, E.; ABLAD, B.; BRANSTROM, A.; CARLSSON, B.: Differentiated Blockade of the Chronotropic Effects of Various Adrenergic Stimuli in the Cat Heart. *Life Sci.* 11, 953-958
22. CARSWELL, H.; NAHORSKI, S.R.: β -Adrenoceptor Heterogeneity in Guinea-Pig Airways: Comparison of Functional and Receptor Labelling Studies. *Brit. J. Pharmacol.* 79, 965-971 (1983)
23. CERIONE, A.R.; CODINA, J.; BENOVIC, J.L.; LEFKOWITZ, R. J.; BIRN-BAUMER, L.; CARON, M.G.: The Mammalian β_2 -Adrenergic Receptor: Reconstitution of Functional Interactions Between Pure Receptor and Pure Stimulatory Nucleotide Binding Proteins of the Adenylate Cyclase System. *Biochemistry* 23, 4519-4525 (1984)

24. CHENG, Y.C.; PRUSSOFF, W.H.: Relationship Between the Inhibition Constant (K_i) and the Concentration of Inhibitor which Causes 50 per cent Inhibition (I_{50}) of an Enzymatic Reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108 (1973)
25. CLELAND, W.W.: Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH-Groups. *Biochemistry* 3 (Suppl. 3), 480-482 (1964)
26. CONTRERAS, M.L.; WOLFE, B.B.; MOLINOFF, P.B.: Thermodynamic Properties of Agonist Interactions with the Beta Adrenergic Receptor-Coupled Adenylate Cyclase System. I. High- and Low-Affinity States of Agonist Binding to Membrane-Bound Beta Adrenergic Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, Vol. 237 (Suppl. 1), 154-164, (1986)
27. DE LEAN, A.; STADEL, J.M.; LEFKOWITZ, R.J.: A Ternary Complex Model Explains the Agonist-Specific Binding Properties of the Adenylate Cyclase-Coupled β -Adrenergic Receptor. *J. Biol. Chem.* 255, 7108-7117 (1980)
28. DE MEYTS, P.; ROTH, J.; NEVILLE, D.M. Jr.; GAVIN, J.R., LES-
NIAK, M.A.: Insulin Interactions with its Receptors: Experimental Evidence for Negative Cooperativity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 154-164 (1973)
29. DULIS, B.V.; WILSON, I.B.: The Beta- Adrenergic Receptor of Live Human Polymorphnuclear Leucocytes. *J. Biol. Chem.* 255 (3), 1043-1048 (1980)
30. EHRLICH, P.: On Partial Functions of the Cell; Nobel lecture. In the collected papers of P. Ehrlich, Vol. 3, 183 (F. Himmelweit, M. Marquart, and H. Dale, eds.). Pergamon Press, Oxford (1956)
31. ENGEL, G.: Identification of Different Subgroups of Beta Receptors by means of Binding Studies in Guinea-Pig and Human Lung. *Tringle* 19 (2), 69-76 (1980)
32. ENGEL, G.; HOYER, D.; BERTHOLD, R.; WAGNER, H.: ($\pm$)¹²⁵Iodocyanopindolol, a New Ligand for β -Adrenoceptors: Identification and Quantification of Subclasses of β -Adrenoceptors in Guinea Pig. *Arch. Pharmacol.* (Naunyn-Schmiedeberg's) 317, 277-285 (1981)
33. FISCHER, E.: Einfluß der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 27, 2985 (1894)
34. FISZ, M.: Wahrscheinlichkeitsrechnung und mathematische Statistik. VEB, Deutscher Verlag der Wissenschaften, 5.Aufl. (1970)

35. FITZGERALD, D.J.; DOYLE, V.; O'BRIAN, E.T.; KELLY, J.G.; O'MALLEY, K.: Beta-Adrenoceptor Density and Responsiveness in Borderline Hypertension. *J. Hypertension* 1 (Suppl. 2), 260-262 (1983)
36. FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Bibliograph. Inst. Mannheim, 4. Aufl., 120-132 (1984)
37. HALPER, J.P.; MANN, J.J.; WEKSLER, M.E.; BILEZIKIAN, J.P.; SWEENEY, J.A.; BROWN, R.P.; GOLBOURNE, T.: Beta Adrenergic Receptors and Cyclic AMP Levels in Intact Human Lymphocytes: Effects of Age and Gender. *Life Sci.* 35, 855-863 (1984)
38. HOYER, D.; ENGEL, G.; BERTHOLD, R.: Binding Characteristics of (+)-, (±)- and (-)-(¹²⁵Iodo)-Cyanopindolol to Guinea-Pig Left Ventricle Membranes. *Arch. Pharmacol. (Naunyn-Schmiedeberg's)* 318, 319-329 (1982)
39. HOYER, D.; ENGEL, G.; KALKMAN, H.O.: Characterization of the 5-HT_{1B} Recognition Site in Rat Brain: Binding Studies with (-)-¹²⁵Iodocyanopindolol. *Eur. J. Pharmacol.* 118, 1-12 (1985)
40. JACOBS, S.; CHANG, K.-J.; CUATRECASAS, P.: Estimation of Hormone Receptor Affinity by Competitive Displacement of Labeled Ligand: Effect of Concentration and of Labeled Ligand. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 66 (2), 687-692 (1975)
41. KONIGSBERG, W.: Reduction of Disulfide Bonds in Proteins with Dithiothreitol. *Methods Enzymol.* 25 (Part B), 387-392 (1972)
42. KRAWIETZ, W.; WERDAN, K.; SCHOBEL, M.; ERDMANN, E.; RIND-FLEISCH, G.E.; HANNING, K.: Different Numbers of β-Receptors on Human Lymphocyte Subpopulations. *Biochem. Pharmacol.* 31, 133-136 (1985)
43. KRAWIETZ, W.; KLEIN, E.M.; UNTERBERG, C.; ACKENHEIL, M.: Physical Activity Decreases the Number of β-Adrenergic Receptors on Human Lymphocytes. *Klin. Wochenschrift* 63, 73-78 (1985)
44. KÜHL, P.W.: A redox cycling model for the action of β-adrenergic agonists. *Experientia* 41, 1118-1122 (1985)
45. LANDMANN, R.; BITTIGER, H.; BÜHLER, F.R.: Human Lymphocytes as a Model for Beta-Adrenergic Receptors in Clinical Investigation. *J. Receptor Res.* 3, 71-88 (1983)
46. LANDMANN, R.; BITTIGER, H.; BÜHLER, F.R.: High Affinity Beta-2-Adrenergic Receptors in Mononuclear Leucocytes: Similar Density in Young and Old Normal Subjects. *Life Sci.* 29, 1761-1771 (1981)
47. LANDMANN, R.; BÜRGISSER, E.; WESP, M.; BÜHLER, F.R.: Betaadrennergic Receptors are Different in Subpopulations of Human Circulating Lymphocytes. *J. Recept. Res.* 4, 37-50 (1980)

48. LANDS, A.H.; ARNOLD, A.; MCAUCLIFF, J.P.; LUDENA, F.P.; BROWN, T.G.: Differentiation of Receptor Systems Activated by Sympathomimetic Amines. *Nature* 214, 597-598 (1967)
49. LANDS, A.H.; LUDENA, F.P.; BUZZO, H.J.: Differentiation of Receptors Responsive to Isoproterenol. *Life Sci.* 6, 2241-2249 (1967)
50. LANGLEY, J.N.: On the Physiology of the Salivary Secretion. *J. Physiol. (London)* 1, 339 (1878)
51. LANGLEY, J.N.: On the Reaction of Cells and of Nerve Endings to Certain Poisons, Chiefly as Regards the Reaction of Striated Muscle to Nicotine and to Curare. *J. Physiol.* 33, 374-413 (1906)
52. LANGLEY, J.N.: On contraction of Muscle, Chiefly in Relation to the Presence of "Receptive" Substances. *J. Physiol.* 36, 347 (1907)
53. LEFKOWITZ, R.J.; MURKHERJE, C.; COVERSTONE, M.; CARON, M.G.: Stereospecific ^3H -(-)-Alprenolol Binding Sites, Beta-Adrenergic Receptors and Adenylate Cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 60, 703-709 (1974)
54. LIEBL, B.; ANHÄUPL, T.; HAEN, E.; REMIEN, J.: (-)- ^{125}I iodocyanopindolol Binding to β -Adrenoceptors on Human Lymphocytes: High and Low Affinity Binding Sites and Their Modification by Dithiothreitol and other Thiols. (in Vorbereitung)
55. LUCAS, M.; HANOUNE, J.; BOCKAERT, J.: Chemical Modification of the Beta-Adrenergic Receptors Coupled with Adenylate Cyclase by Disulfide Bridge-Reducing Agents. *Mol. Pharmacol.* 14, 227-236 (1978)
56. LYSKO, P.G.; HENNEBERG, R.C.: Differentiation between Amine Transport and β -Adrenergic Receptor-Mediated Binding in Cultured Mammalian Cells. *Mol. Pharmacol.* 28, 238-347 (1985)
57. MAGUIRE, M.E.; WIKLUND, R.A.; ANDERSSON, H.J.; GILMAN, A.G.: Binding of ^{125}J -iodohydroxybenzylpindolol to putative Beta-Adrenergic Receptors of Rat Glioma Cells and other Cell Clones. *J. Biol. Chem.* 251, 1221-1231 (1976)
58. MAHLER, H.R.; CORDES, E.H.: Basic Biological Chemistry. Harper and Row, N.Y. 24, 346 (1968)
59. MCGONIGLE, P.; NEVE, K.A.; MOLINOFF, P.B.: A Quantitative Method of Analyzing the Interaction of Slightly Selective Radioligands with Multiple Receptor Subtypes. *Mol. Pharmacol.* 30, 329-338 (1986)
60. MCPHERSON, G.A.: Analysis of Radioligand Binding Experiments: A Collection of Computer Programs for the IBM PC. *J. Pharmacol. Methods* 14, 213-228 (1985)

61. MIDDEKE, M.; REMIEN, J.; HOLZGREVE, H.: The Influence of Sex, Age, Blood Pressure and Physical Stress on β_2 -Adrenoceptor Density of Mononuclear Cells. *J. of Hypertension* 2 (3), (1984)
62. MOLINOFF, B.; WOLFE, B.B.; WEILAND, G.A.: Quantitative Analysis of Drug-Receptor Interactions: II. Determination of the Properties of Receptor-Subtypes. *Life Sci.* 29, 427-443 (1981)
63. MOTULSKY, H.J.; CUNNINGHAM, E.M.S.; DEBLASI, A.; INSEL, P.A.: Desensitization and Redistribution of β -Adrenergic Receptors on Human Mononuclear Leucocytes. *Am. J. Physiol.* (13), 583-590 (1986)
64. MOTULSKY, H.J.; MAHAN, L.C.: The Kinetics of Competitive Radioligand Binding Predicted by the Law of Mass Action. *Mol. Pharmacol.* 25, 1-9 (1984)
65. NERME, V.; SEVERNE, Y.; ABRAHAMSON, T.; VAUQUELIN, G.: Spontaneous Coupling of the β -Adrenergic Receptor to N_G in Mammalian Cardiac Membranes. *Mol. Pharmacol.* 30, 1-5 (1986)
66. NEVE, K.A.; MCGONIGLE, P.; MOLINOFF, P.B.: Quantitative Analysis of the Selectivity of Radioligands for Subtypes of Beta Adrenergic Receptors. *J. of Pharmacol. and Exper. Ther.* 238 (1), 46-53 (1986)
67. O' HARA, N.; BRODDE, O.E.: Identical Binding Properties of (+) and (-)- 125 Iodocyanopindolol to β_2 -Adrenoceptors in Intact Human Lymphocytes. *Arch. int. Pharmacodyn.* 272, 24-39 (1984)
68. PEDERSEN, S.E.; ROSS, E.M.: Functional Activation of β -Adrenergic Receptors by Thiols in the Presence and Absence of Agonists. *J. Biol. Chem.* 260 (26), 14150-14157 (1986)
69. PORZIG, H.; BAER, M.; CHANTON, C.: Properties of Beta-Adrenoceptor Sites in Metabolizing and Non-Metabolizing Rat Reticulocytes and in Resealed Reticulocyte Ghosts. *Arch. Pharmacol. (Naunyn-Schmiedeberg's)* 317, 286-293 (1979)
70. PRIOR, T.I.; PATEL, V.; DRUMMOND, G.I.: Inactivation of the β -Adrenergic Receptor in Cardiac Muscle by Dithiols. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63 (8), 932-936 (1985)
71. REMIEN, J.: β -Adrenoceptors in Live Lymphocytes. *Proceed. 2nd Intern. Conf. on Immunopharmacology, Washington* (1982)
72. REMIEN, J.: β -Adrenoceptor Recognition Sites in Living Lymphocytes: A Model for Receptor Properties in Human Disease? *Eur. J. of Respir. Dis.* 65 (Suppl. 135), 208-214 (1984)

73. REMIEN, J.; LANDROCK, A.: β -Adrenoceptors in Intact and Disrupted Mammalian Blood cells: Identification, Characterisation and Localisation. Arch. Pharmacol. (Naunyn-Schmiedeberg's) 319, R 65 (1982)
74. REMIEN, J.; LANDROCK, A.: Differentiated Characteristics of Beta-Adrenoceptor Recognition Sites in Live and Disrupted Lymphocytes. Proceed. Receptors and Cold, Utrecht (1982)
75. REPKE, H.; LIEBMANN, C.: Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme. Akademie-Verlag, Ost-Berlin, 1987
76. RICHARDSON, A.; HOWLETT, D.R.: A Method for Dissecting Two Site Receptor Interactions in Ligand Binding Studies. J. Receptor Res. 3 (4), 541-560 (1983)
77. ROSS, E.M.; MAGUIRE, M.E.; STURGILL, T.W.; BILTONEN, R.L.; GILMAN, A.G.: Relationship Between the β -Adrenergic Receptor and Adenylate Cyclase. J. Biol. Chem. 252, 5761-5775 (1977)
78. SACHS, L.: Angewandte Stochastik. Springer Verlag Berlin, 6. Aufl. (1984)
79. SAGER, G.; SANDNESS, D.; AAKESSON, I.; JACOBSEN, S.: Effect of Serum, Alpha-1 Acid Glycoprotein, Lipoproteins and Albumin on Human Mononuclear Leucocyte β -Adrenoceptors. Acta Pharmacol. et Toxicol. 58, 193-203 (1986)
80. SANDNESS, D.; GJERDE, J.; REFSNES, M.; JACOBSEN, S.: Down-Regulation of Surface Beta-Adrenoceptors on Intact Human Mononuclear Leucocytes. Biochem. Pharmacol. 36, 1301-1311 (1987)
81. SCATCHARD, G.: The Attraction of Proteins for Small Molecules and Ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672 (1949)
82. STADEL, J.M.; DE LEAN, A.; LEFKOWITZ, R.J.: The High Affinity Agonist β -Adrenergic Receptor Complex is an Intermediate for Catecholamine Stimulation of Adenylate Cyclase in Turkey and Frog Erythrocyte. J. Biol. Chem. 255, 1436-1441 (1980)
83. VAUQUELIN, G.; BOTTARI, S.; KANAREK, L.; STROSBERG, A.D.: Evidence for Essential Disulfide Bonds in β_1 -Adrenergic Receptors of Turkey Erythrocyte Membranes. Inactivation by Dithiothreitol. J. Biol. Chem. 254 (Suppl. 11), 4462-4469 (1979)
84. VAUQUELIN, G.; BOTTARI, S.; STROSBERG, A.D.: Inactivation of β -Adrenergic Receptors by N-Ethylmaleinimid: Permissive Role of β -Adrenergic Agents in Relation to Adenylate Cyclase Activation. Mol. Pharmacol. 17, 163-171 (1979)
85. VAUQUELIN, G.; SEVERNE, Y.; BOTTARI, S.; ANDRE, C.: Agonist-Mediated Conformational Modification of β -Adrenergic Receptors in: Catecholamines: Basic and Peripheral Mechanisms. Alan R. Liss Inc., New York, 271-278 (1984)

86. WEILAND, G.A.; MOLINOFF, B.: Quantitative Analysis of Drug-Receptor Interactions: II. Determination of Kinetic and Equilibrium Properties. *Life Sci.* 29, 427-443 (1981)
87. WONG, A.; HWANG, S.M.; CHENG, H.-Y.; CROOKE, S.T.: Structure-Activity Relationships of β -Adrenergic Receptor-Coupled Adenylate Cyclase: Implications of a Redox Mechanism for the Action of Agonists at β -Adrenergic Receptors. *Mol. Pharmacol.* 31, 368-376 (1987)
88. WRIGHT, M.; DRUMMOND, G.I.: Inactivation of the β -Adrenergic Receptor in Skeletal Muscle by Dithiols. *Biochem. Pharmacol.* 32 (Suppl. 3), 509-515 (1983)
89. YAMAOKA, K.; TANIGAWARA, Y.; NAKAGAWA, T.; UNO, T.: A Pharmacokinetic Analysis Program (MULTI) for Microcomputer. *J. Pharm. Dyn.* 4, 879-885 (1981)

DANKSAGUNG

Zu besonderem Dank bin ich verpflichtet:

Herrn Professor Dr. Jörg Remien, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, München, für die Überlassung des Themas, die fortlaufende Unterstützung, sowie für viele anregende und lehrreiche Diskussionen während der Durchführung der Versuche.

Herrn Bernhard Liebl, mit dem ich einen Großteil der Versuche durchführte und auswertete.

Herrn Dr. Reinhard Naar, Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, München, für die Erstellung von statistischen Programmen und seine unermüdliche Hilfe und Beratung bei den EDV-Arbeiten.

Frau Annegret Landrock, Frau Sybille Kirzinger, Frau Iris Reithmeier und Frau Christina Lemmermann für Rat und Beistand in labortechnischen Fragen.

LEBENSIAUF

Ich, Thomas Anhäupl, wurde am 10. Januar 1958 als zweites von drei Kindern des Rektors an Volksschulen Adolf Anhäupl und seiner Frau Berta Anhäupl, geb. Wiesneth, in Weiden i.d. Oberpfalz geboren.

Im Anschluß an die Grundschule (1964-1968) besuchte ich das Werner-von-Siemens-Gymnasium in Regensburg, wo ich im Juni 1977 das Abitur ablegte.

Nach Ableistung des Wehrdienstes (1977-1978) studierte ich vom Herbst 1978 bis zum Sommer 1980 Pharmazie an der Universität Regensburg und absolvierte den ersten Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung im Herbst 1980. Zum Wintersemester 1980/81 begann ich das Medizinstudium an der Universität Regensburg, an der ich im Frühjahr 1982 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Sodann wechselte ich an die Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach dem ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung im März 1983 und dem zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung im März 1985 beendete ich das Studium mit dem dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung im April 1986. Die Approbation als Arzt wurde mir im Mai 1986 erteilt.

Seit Januar 1987 arbeite ich als wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Anaesthesie und Intensivmedizin der Universität Erlangen.

